



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar

Autor: Sandra Marcela Gómez Rueda
Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
Co-Orientador: Prof. Dr. Aline Carvalho da Costa

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo
Junho 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

G586p Gómez Rueda, Sandra Marcela
Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de
Cana-de-açúcar/ Sandra Marcela Gómez Rueda. --
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Rubens Maciel Filho, Aline Carvalho
da Costa.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ácido fosfórico. 2. Pré-tratamento. 3. Ácido
sulfúrico. 4. Hidrólise enzimática. 5. Biocombustíveis.
I. Maciel Filho, Rubens. II. Costa, Aline Carvalho da.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Pre-treatment and enzymatic hydrolysis of sugar cane
bagasse

Palavras-chave em Inglês: Phosphoric acid, Pre-treatment, Sulfuric
acid, Enzymatic hydrolysis, Biofuels

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

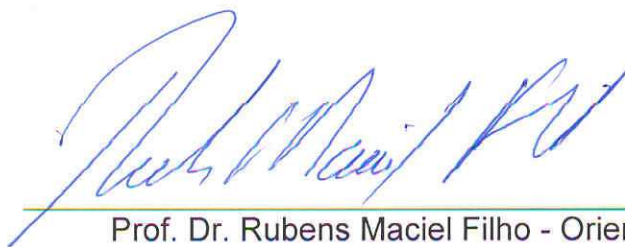
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Carlos Eduardo Vaz Rossell, Charles Dayan Farias
de Jesus


Data da defesa: 14/06/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Sandra Marcela Gomez Rueda e aprovada em 14 de Junho de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rubens Maciel Filho', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho - Orientador

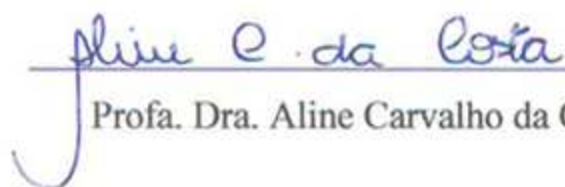
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Eduardo Vaz Rossell', written over a horizontal line.

Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell - Titular 1

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Charles Dayan Farias de Jesus', written over a horizontal line.

Dr. Charles Dayan Farias de Jesus – Titular 2

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em
Engenharia Química.



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

A Tí Papito Dios, por darme la oportunidad
de hacer realidad una de tantas pomesas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, dono da minha vida.

A meus pais Mariela e Abelardo, meus irmãos Alex, Mauricio e Ivon, e meu namorado Carlos Mario, por terem dado apoio suficiente para a culminação desta etapa da minha vida.

A minhas amigas Natalia, Ana Maria e Sarita por ter compartilhado juntas momentos de alegria e tristeza.

Ao laboratório de processos fermentativos e enzimáticos LEPFE pelo apoio no desenvolvimento experimental da minha tese. A Fapesp pelo apoio financeiro e aos professores Rubens Maciel e Aline Carvalho por ter me ajudado com seus conhecimentos.

Ao laboratório de otimização, projeto e controle avançado LOPCA e a Faculdade de engenharia química FEQ, por ter me auxiliado no empréstimo de equipamentos e materiais.

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a produção de açúcares fermentescíveis a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com os ácidos sulfúrico (H_2SO_4) e fosfórico (H_3PO_4) diluídos e deslignificado com hidróxido de sódio (NaOH). Planejamentos fatoriais 2^3 foram realizados para avaliar a influência do tempo de pré-tratamento (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de H_2SO_4 ou H_3PO_4 . Depois do pré-tratamento ácido, o bagaço foi deslignificado por 1h a 100°C com 1%p/v. Os resultados mostraram que ambos pré-tratamentos podem levar a altos rendimentos de glicose na hidrólise enzimática. Os melhores resultados para o ácido fosfórico foram obtidos quando o bagaço foi pré-tratado a 140°C , 120 min e 0,5%p/v H_3PO_4 . Após deslignificação com NaOH e hidrólise enzimática com 15 FPU/g de bagaço pré-tratado e 7,5 CBU/g de bagaço pré-tratado houve liberação de 367 mg de glicose/g bagaço sem pré-tratar, que corresponde a um rendimento de 88%. Quando o ácido sulfúrico foi usado, os melhores resultados foram obtidos para pré-tratamentos a 100°C por 15 min e com 0,5%p/v de H_2SO_4 . Após deslignificação e hidrólise enzimática nas mesmas condições usadas para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico, o bagaço apresentou liberação de 380,6 mg de glicose/g bagaço sem pré-tratar, que corresponde a rendimento de 92%. Devido aos bons resultados obtidos usando ácido fosfórico sendo este pré-tratamento menos estudado do que o pré-tratamento com ácido sulfúrico, o pré-tratamento com este ácido foi escolhido para a etapa posterior. Nesta etapa foram feitos ensaios para determinar a influência das concentrações das enzimas celulase e β -glicosidase no rendimento de glicose. O bagaço foi pré-tratado com ácido fosfórico diluído nas melhores condições determinadas, deslignificado com NaOH e hidrolisado com concentrações de celulase e β -glicosidase variando segundo um planejamento composto central. Trabalhando-se com concentrações de celulase de 30 FPU/g e de β -glicosidade de 25 CBU/g foi possível obter rendimento de 97,1%. Rendimento de 95,10% apenas um pouco mais baixo, foi obtido com 25,85 FPU/g de celulase e 7,33 CBU/g de β -glicosidade.

ABSTRACT

In this work the production of fermentable sugars from sugar cane bagasse pre-treated with diluted sulfuric acid and phosphoric acid and delignified with NaOH was studied. 2^3 Factorial designs were performed to evaluate the influence of pretreatment time (h), temperature ($^{\circ}\text{C}$) and acid concentration (H_2SO_4 or H_3PO_4). After pretreatment bagasse was delignified for 1 hour at 100°C with 1% p/v NaOH. The results have shown that both pre-treatments can lead to high glucose yields at enzymatic hydrolysis. The best results for the pretreatment with phosphoric acid was when bagasse was pretreated at 140°C , 120 min and 0.5% p/v H_3PO_4 . After delignification with NaOH and enzymatic hydrolysis with 15 FPU/g of cellulase and 7,5 CBU/g of β -glucosidase, 367 mg glucose/g untreated bagasse were released, corresponding to a 88% yield. When sulfuric acid was used, the best results were obtained for pretreatment at 100°C , for 15 min and with 0,5%p/v of H_2SO_4 . After delignification and hydrolysis at the same conditions used in the phosphoric acid pretreatment, glucose release was of 380,6 mg glucose/g non pretreated bagasse, corresponding to a 92% yield. Due to the good results obtained using phosphoric acid and because pretreatment with this acid is less studied than with sulfuric acid, it was chosen for the posterior stages of the study. In this stage experimental assays were performed to determine the influence of cellulase and β -glucosidase loads on glucose yield at hydrolysis. Bagasse was pretreated with diluted phosphoric acid at the best conditions, delignified with NaOH and hydrolysed with cellulase and β -glucosidase loads varying according to a central composite factorial design. Yield of 97.17% was obtained with 30 FPU/g of cellulase and 25 CBU/g of β -glucosidase. Yield of 95.10%, only a little lower, was obtained with 25.85 FPU/g of cellulase and 7.33 CBU/g of β -glucosidase.

INDICE

RESUMO

ABSTRACT

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	16
NOMENCLATURA	20

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	21
-------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
--	-----------

2.1. Biomassa	24
2.2. Constituição geral dos materiais lignocelulósicos	24
2.2.1. Celulose	26
2.2.2. Lignina	27
2.2.3. Hemicelulose	28
2.2.4. Constituintes menores	29
2.3. Separação dos componentes da biomassa e sua transformação	30
2.4. Cana-de-açúcar	31
2.4.1. Bagaço de cana-de-açúcar	32
2.5. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos	34
2.5.1. Tipos de pré-tratamentos	35
2.5.1.1. Pré-tratamento com ácido diluído	37
2.5.2. Reações químicas durante o pré-tratamento	38
2.5.2.1. Degradação da celulose	38
2.5.2.2. Degradação da hemicelulose	39
2.5.2.3. Degradação da lignina	40
2.6. Hidrólise	41
2.6.1. Tipos de hidrólises	42
2.6.1.1. Hidrólise enzimática	43
2.6.1.1.1. Classificação das enzimas celulolíticas	44
2.6.1.1.1.2. Sistemas celulolíticos e sinergismo	44

2.7.	Produção biotecnológica de etanol	45
CAPÍTULO 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL		47
3.1.	Materiais	47
3.1.1.	Equipamentos	47
3.1.2.	Reagentes	48
3.2.	Matéria-prima	48
3.2.1.	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	48
3.2.1.1.	Teor de umidade	49
3.2.1.2.	Determinação de cinzas e extrativos	49
3.2.1.3.	Determinação de lignina solúvel e insolúvel	50
3.2.1.4.	Determinação de carboidratos	50
3.3.	Procedimentos experimentais	51
3.3.1.	Pré-tratamento	51
3.3.2.	Atividade enzimática	51
3.3.2.1.	Atividade da Celulase	51
3.3.2.2.	Atividade da β -glicosidase	52
3.3.3.	Hidrólise enzimática	52
3.3.4.	Determinação de açúcares	53
3.4.	Planejamento de experimentos	53
3.4.1.	Pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico diluídos	53
3.4.2.	Determinação da carga enzimática mínima para altos rendimentos	54
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSOES		55
4.1.	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	55
4.2.	Planejamento 2 ² do pré-tratamento com ácido sulfúrico	55
4.2.1.	Análise composicional no pré-tratamento com ácido sulfúrico	59
4.2.2.	Teste de deslignificação com hidróxido de sódio	63
4.3.	Planejamento 2 ³ do pré-tratamento com ácido sulfúrico	64
4.3.1.	Determinação dos efeitos principais e de interação das variáveis	69
4.3.2.	Análise estatística da massa de glicose liberadas na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico	71
4.4.	Planejamento 2 ³ do pré-tratamento com ácido fosfórico	75
4.4.1.	Determinação dos efeitos principais e de interação das variáveis	80

4.4.2. Análise estatístico da massa de glicose liberada na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico	81
4.5. Seleção da melhor condição de cada pré-tratamento	85
4.6. Seleção do pré-tratamento a ser usado nas etapas posteriores	86
4.7. Comparação com outros pré-tratamentos ácidos	88
4.8. Comparação dos resultados com os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino e cal	89
4.9. Experimentos com variação na carga enzimática	91
4.9.1. Planejamento 2^2 + configuração estrela para a obtenção de dados cinéticos do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio	92
4.9.2. Análise estatística do rendimento em glicose na hidrólise	96
4.9.3. Carga enzimática mínima	99
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES	100
CAPÍTULO 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	102
CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
APÊNDICE A	118
APÊNDICE B	120
APÊNDICE C	122
APÊNDICE D	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Constituição geral dos materiais lignocelulósicos. (Dekker, 1983).

Figura 2.2. Estrutura simplificada da célula da madeira: P=parede primaria, S₁, S₂, S₃ = parede secundaria, ML = lamela media, W = camada de verrugas. (Sjöström, 1981).

Figura 2.3. Estrutura da celulose. (Fengel e Wagener, 1984).

Figura 2.4. Estrutura geral da lignina. (American Chemical Society, 2000).

Figura 2.5. Unidades de açúcares que compõem as polioses. (Fengel e Wagener, 1984).

Figura 2.6. Esquema de separação dos componentes da biomassa. (Schuchardt et al., 2001).

Figura 2.7. Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por Hsu et al., 1980).

Figura 2.8. Degradação ácida da celulose (Holtzaple, 1985).

Figura 2.9. Degradação da hemicelulose (Holtzaple, 1985).

Figura 2.10. Produtos de degradação da lignina de madeira Aspen pré-tratado com vapor (Stanek, 1958).

Figura 2.11. Estrutura química da lignina (Sarkanen, 1971).

Figura 2.12. Diferenciação de processos de produção de bioetanol (Camus *et al.*, 2006) .

Figura 3.0. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 4.1a. Massa de bagaço solubilizada após o pré-tratamento e hidrolisada.

Figura 4.1b. Massa de bagaço solubilizada após o pré-tratamento e hidrolisada.

Figura 4.21. Perfil da hidrólise do ensaio 3, 3,5%p/vH₂SO₄ e 15 min.

Figura 4.2b. Perfil da hidrólise do ensaio 2, 5%p/v H₂SO₄ E 180min.

Figura 4.3. Ensaio 1 (100°C, 15 min, 0,5%p/vH₂SO₄).

Figura 4.4 Ensaio 2 (140°C, 15 min, 0,5%p/v H₂SO₄).

Figura 4.5. Ensaio 3 (100°C, 120 min, 0,5%p/v H₂SO₄).

Figura 4.6. Ensaio 4 (140°C, 120 min, 0,5%p/v H₂SO₄).

Figura 4.7. Ensaio 5 (100°C, 15 min, 4%p/v H₂SO₄).

Figura 4.8. Ensaio 6 (140°C, 15 min, 4%p/v H₂SO₄).

Figura 4.9. Ensaio 7 (100°C, 120 min, 4%p/v H₂SO₄).

Figura 4.10. Ensaio 8 (140°C, 120 min, 4%p/v H₂SO₄).

Figura 4.11. Ensaios 9,10 e 11 (120°C, 68 min, 2,25%p/vH₂SO₄).

Figura 4.12. Gráfico de Pareto para a massa de glicose liberada para planejamento 2³ com ácido sulfúrico.

Figura 4.13. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação 5. Temperatura 100°C.

Figura 4.14. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação 5. Temperatura 140°C.

Figura 4.15. Ensaio 1(100°C, 15 min, 0,5%p/v H₃PO₄).

Figura 4.16. Ensaio 2 (140°C, 15 min, 0,5% p/v H_3PO_4).

Figura 4.17. Ensaio 3 (100°C, 120 min, 0,5% p/v H_3PO_4).

Figura 4.18. Ensaio 4 (140°C, 120 min, 0,5% p/v H_3PO_4).

Figura 4.19. Ensaio 5 (100°C, 15 min, 4% p/v H_3PO_4).

Figura 4.20. Ensaio 6 (140°C, 15min, 4% p/v H_3PO_4).

Figura 4.21. Ensaio 7 (100°C, 120 min, 4% p/v H_3PO_4).

Figura 4.22. Ensaio 8 (140°C, 120 min, 4% p/v H_3PO_4).

Figura 4.23. Ensaios 9, 10 e 11 (120°C, 67,5 min, 2,25% p/v H_3PO_4).

Figura 4.24. Gráfico de Pareto para a massa de glicose liberada para planejamento 2^3 com ácido fosfórico.

Figuras 4.25. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação 6. Concentração de ácido 0,5%p/v.

Figuras 4.26. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação 6. Concentração de ácido 4%p/v.

Figura 4.27. Bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio. A- bagaço sem pré-tratar, B- bagaço pré-tratado com ácido fosfórico, C- bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio.

Figura 4.28. Concentrações de celobiose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

Figura 4.29. Concentrações de glicose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

Figura 4.30. Concentrações de xilose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

Figura 4.31. Concentrações de arabinose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

Figura 4.32. Gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e β -glicosidase para o rendimento em glicose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Métodos de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos.

Tabela 4.0. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 4.1a. Faixa de valores estudados no planejamento 2^2 do pré-tratamento com ácido sulfúrico.

Tabela 4.1b. Faixa de valores estudados no planejamento 2^2 do pré-tratamento com ácido sulfúrico.

Tabela 4.2a. Matriz do planejamento 2^2 do pré-tratamento com ácido sulfúrico.

Tabela 4.2b. Matriz do planejamento 2^2 do pré-tratamento com ácido sulfúrico.

Tabela 4.3a. Composição do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.

Tabela 4.3b. Composição do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.

Tabela 4.4a. Balanço de massa do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.

Tabela 4.4b. Balanço de massa do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.

Tabela 4.5. Condições da deslignificação com NaOH.

Tabela 4.6. Balanço de massa do bagaço pré-tratado com H_2SO_4 e deslignificado com NaOH e produção de glicose após hidrólise.

Tabela 4.7. Faixa de valores estudados no planejamento 2^3 com ácido sulfúrico.

Tabela 4.8. Valores das variáveis em cada um dos ensaios para o pré-tratamento com ácido sulfúrico.

Tabela 4.9. Matriz de planejamento com os resultados da massa de glicose e ART liberados na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e deslignificado com NaOH.

Tabela 4.10. Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2^3 com ácido sulfúrico.

Tabela 4.11. Análise da variância do modelo para o planejamento 2^3 com ácido sulfúrico.

Tabela 4.12. Faixa de valores estudados no planejamento 2^3 com ácido fosfórico.

Tabela 4.13. Valores das variáveis em cada um dos ensaios para o pré-tratamento com ácido fosfórico.

Tabela 4.14. Matriz de planejamento com os resultados da massa de glicose e ART liberados na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico.

Tabela 4.15. Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento 2^3 com ácido fosfórico.

Tabela 4.16. Análise de variância (ANOVA) do modelo para o planejamento 2^3 com ácido fosfórico.

Tabela 4.17. Rendimentos na hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e deslignificado com hidróxido de sódio.

Tabela 4.18. Rendimentos na hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio.

Tabela 4.19. Matriz de planejamento composto central para a variação de carga enzimática.

Tabela 4.20. Matriz de planejamento composto central para a variação de carga enzimática.

Tabela 4.21. Análise de variância (ANOVA) do modelo para o planejamento estrela.

Tabela 4.22. Efeitos principais e das variáveis para o planejamento estrela com variação na carga enzimática.

Tabela A.1. Dados de concentração de glicose do planejamento 2^3 com ácido sulfúrico.

Tabela A.2. Dados de concentração de ART do planejamento 2^3 com ácido sulfúrico.

Tabela B.1. Dados de concentração de glicose do planejamento 2^3 com ácido fosfórico.

Tabela B.2. Dados de concentração de ART do planejamento 2^3 com ácido fosfórico.

Tabela C.1. Dados de celobiose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela C.2. Dados de celobiose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela C.3. Dados de glicose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela C.4. Dados de glicose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela C.5. Dados de xilose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela C.6. Dados de xilose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela C.7. Dados de arabinose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela C.8. Dados de arabinose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática.

Tabela D.1. Composição da xilana e lignina usando o mesmo bagaço, pré-tratado com diferentes agentes.

NOMENCLATURA

ART: açúcares redutores totais

a.s: absolutamente seca

CBU: unidades de celobiose

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

FPU: unidades de papel filtro

g: gramas

H₂SO₄: ácido sulfúrico

H₃PO₄: ácido fosfórico

NaOH: hidróxido de sódio

°C: graus Celsius

HMF: hidroximetilfurfural

L: litros

P: peso

V: volume

h: horas

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O etanol é hoje uma das principais fontes de energia no Brasil. É uma fonte de energia renovável, pouco poluente, e se aplicado em células a combustível, possibilita uma eficiência energética melhor que a utilizada hoje e com praticamente nenhuma emissão de poluentes. Além disso, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, e também o maior produtor de açúcar e etanol. Movimenta anualmente cerca de 12 bilhões de dólares e emprega diretamente um milhão de trabalhadores, e indiretamente cerca 3,5 milhões, com a maior parte das unidades produtoras e de mercado de trabalho localizadas nos Estados de São Paulo e Paraná. Em 2003, a produção de álcool chegou a 14,4 bilhões de litros em todo o país, com o Centro-Sul responsável por 12,9 bilhões de litros desse total, que representa um volume 16,72% acima dos 11.014 bilhões de litros produzidos na safra 2002. Isso se deve às novas variedades de matéria-prima, às condições climáticas favoráveis e à melhoria da eficiência industrial das unidades produtoras (Lessa dos Santos et al., 2005).

O etanol feito a partir da biomassa lignocelulósica é amplamente aceito como um substituto ou como um aditivo de combustível de fósseis, devido à seu insignificante impacto sobre o ambiente (Lugar e Woolsey, 1999; Wyman, 1999; Schell et al., 1998). A celulose, hemicelulose e lignina totalizam cerca de 90% da composição total do material lignocelulósico (Kumar et al., 2009). A produção de etanol a partir deste material exige a conversão do componente holocelulósico (celulose e hemicelulose) da biomassa em açúcares monoméricos para ser convertido em fontes de energia como o etanol (Wyman, 2002; Palonen et al., 2004).

Devido ao interesse na biomassa lignocelulósica como matéria prima por seu baixo custo e disponibilidade, foram realizadas investigações, por mais de duas décadas, sobre a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos renováveis (Gould, et al 1984, Parameswaran, et al, 2009). Usando combustíveis a partir de materiais renováveis não se contribuiria ao aquecimento global, e assim se asseguraria o desenvolvimento sustentável do setor do transporte (Barbel, 1996).

Os principais constituintes dos materiais lignocelulósicos são a celulose, a lignina e a hemicelulose, a composição depende da natureza de cada material. A celulose é um polissacarídeo que pode ser reduzido a glicose por hidrólise química ou enzimática. A lignina é um polímero aromático heterogêneo. A hemicelulose é um polissacarídeo que, sob hidrólise, produz xilose e outros monossacarídeos. A celulose e a hemicelulose presentes em madeiras e resíduos agrícolas são altamente resistentes à despolimerização enzimática. Isto é causado pela presença da capa hemicelulose-lignina que rodeia a celulose, a qual impede o ataque enzimático (Garrote et al., 2002).

A celulose e hemicelulose estão densamente empacotadas por capas de lignina, que as protegem contra o ataque das enzimas. Visando diminuir a cristalinidade da celulose e o aumento da superfície da biomassa, remover a hemicelulose e a lignina, a biomassa é submetida a um pré-tratamento, que pode ser biológico, mecânico, químico ou físico-químico. Nos últimos anos, o tratamento da biomassa lignocelulósica com ácido sulfúrico diluído foi principalmente utilizado como meio de hidrólise da hemicelulose e pré-tratamento para a hidrólise enzimática da celulose (Nathan *et al.*, 1999; Parameswaran, et al, 2009).

Há inúmeras opções de processo, todas elas com um pré-tratamento do material. Pré-tratamentos (remoção da lignina e separação da hemicelulose, em alguns casos) são físicos (picadores, moagem), físico-químicos (auto-hidrólise: descompressão com vapor, com amônia ou com CO₂), químicos (com ozônio, ácidos diluídos ou concentrados, alcalino) ou com solventes (para dissolver a lignina). A maioria dos ácidos minerais podem ser usados para catalisar a hidrólise da hemicelulose (Bhandari et al., 1984, Ohgren et al., 2005, Sassner et al., 2005 e Schell et al., 2003).

O ácido sulfúrico tem sido amplamente investigado por ser um reagente de baixo custo. O ácido fosfórico é aproximadamente 20 vezes mais caro, mas também pode fornecer um material valioso. Estudos recentes têm demonstrado que a hemicelulose de resíduos de milho (Um et al., 2003), bagaço de cana-de-açúcar (Gamez et al., 2006 e Gamez et al., 2004), e palha de sorgo (Vazquez et al., 2007) podem ser eficazmente hidrolisada com soluções contendo 2-6% de ácido fosfórico a 100-122 ° C.

O objetivo deste trabalho é avaliar a etapa de pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico diluídos na hidrólise enzimática, aproveitando o bagaço de cana-de-açúcar para a produção açúcares fermentescíveis. Estes açúcares podem ser usados como meio de fermentação para posterior produção de etanol como combustível. São necessárias as seguintes fases: caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, estudo das condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico diluído através do planejamento experimental, isto é, tempo, temperatura e concentração do reagente, deslignificação com hidróxido de sódio do material pré-tratado com ácidos, análise do comportamento da estrutura da celulose ao ataque ácido, análise da variação da carga enzimática, e otimização da carga enzimática na hidrólise.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa

A biomassa é uma fonte de energia procedente de maneira indireta do sol e pode ser considerada uma fonte de energia renovável sempre que se sigam uns parâmetros ambientais adequados em seu uso e exploração. A formação da biomassa a partir da energia solar se leva a cabo pelo processo denominado fotossíntese vegetal. Mediante a fotossíntese as plantas que contêm clorofila transformam o dióxido de carbono e a água, produtos minerais sem valor energético, em materiais orgânicos com alto conteúdo energético e por sua vez servem de alimento a outros seres vivos. A biomassa mediante estes processos armazena em curto prazo a energia solar em forma de carbono. A energia armazenada no processo fotossintético pode ser posteriormente transformada em energia térmica, elétrica ou em combustíveis de origem vegetal. A biomassa energética pode definir-se como matéria orgânica, de origem vegetal ou animal, incluindo os materiais procedentes de sua transformação natural ou artificial e os resíduos gerados em sua produção e consumo.

A composição química da biomassa em geral apresenta em media 40-50% de celulose, 18-27% de hemicelulose e 18-27% de lignina. O aproveitamento energético dos materiais lignocelulósicos constitui uma das alternativas mais promissoras usando a hidrólise da celulose neles contida para a obtenção de açúcares que posteriormente, por fermentação, conduzem a produtos utilizáveis como combustíveis ou como matérias primas de interesse industrial (Duarte, 1989; Garrote et al., 2002)..

2.2. Constituição geral dos materiais lignocelulósicos

As fibras naturais utilizadas industrialmente provêm, em sua maioria, dos materiais lignocelulósicos. A fibra da madeira é a mais importante economicamente, devido à grande produção de polpa para a fabricação de papel. Embora a maior parte das fibras seja proveniente do tronco das arvores (parte lenhosa), elas também podem vir das folhas e dos frutos, como o sisal e o algodão, respectivamente. Os materiais

lignocelulósicos são constituídos basicamente por celulose, lignina, polioses (hemicelulose) e constituintes menores (orgânicos e inorgânicos).

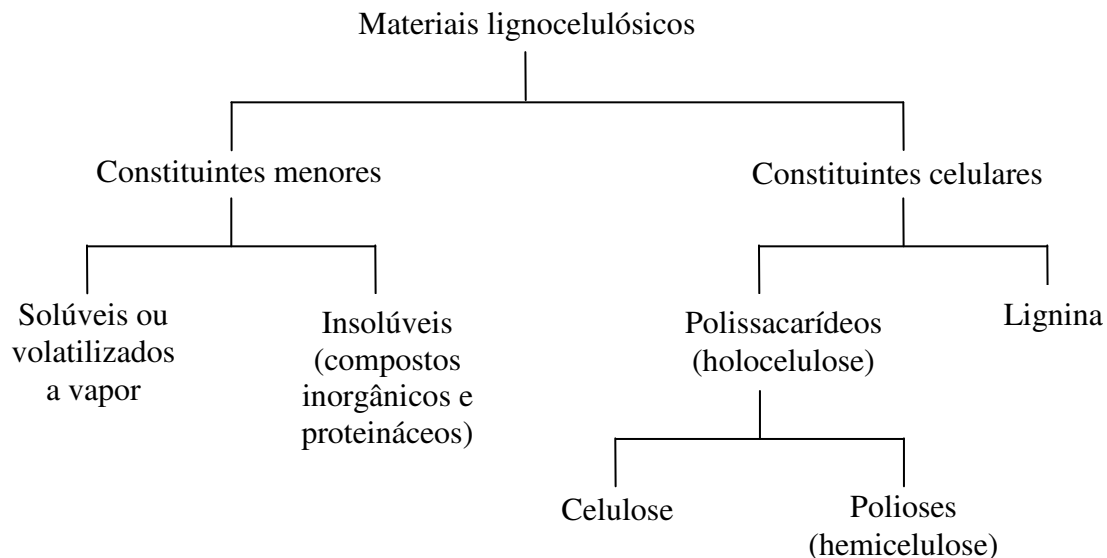


Figura 2.1. Constituição geral dos materiais lignocelulósicos. (Dekker, 1983).

A parede celular dos materiais lignocelulósicos é subdividida em parede primária (P) e parede secundária. A parede secundária é constituída por três camadas: S₁, S₂ e S₃, que diferem entre si por sua estrutura e composição. A lamela média (ML) tem a função de ligar as células.

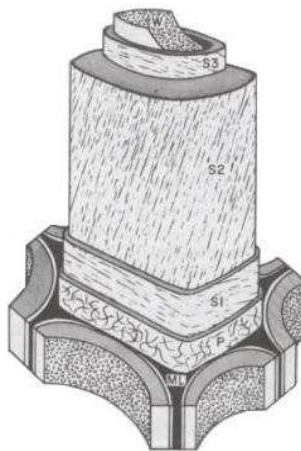


Figura 2.2. Estrutura simplificada da célula da madeira: P=parede primária, S₁, S₂, S₃ = parede secundária, ML = lamela média, W = camada de verrugas. (Sjostrom, 1981).

2.2.1. Celulose

A celulose é a matéria prima mais abundante e está presente na estrutura básica das células de todas as plantas. Ela é um polímero linear e pertence à função química dos hidratos, mais corretamente a dos glicídios. A celulose deve ser descrita como um polissacarídeo formado por unidades de monossacarídeo β -D-glicose. Duas moléculas adjacentes de β -D-glicose são ligadas por eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxilas dos carbonos C₁ e C₄, formando uma unidade celobiose.

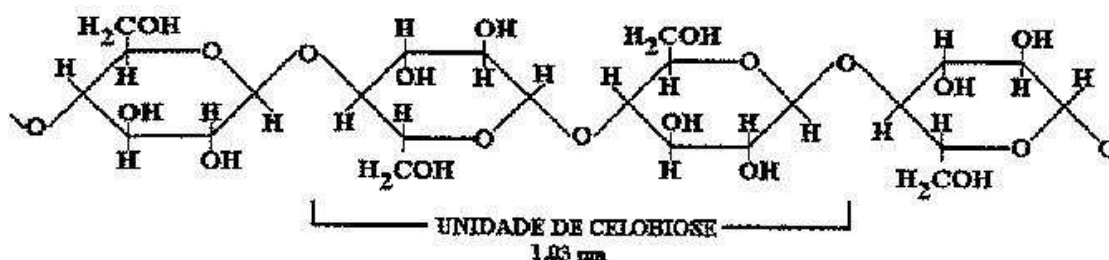


Figura 2.3. Estrutura da celulose. (Fengel e Wagener, 1984).

As moléculas de celulose tendem a formar pontes de hidrogênio intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre as unidades de glicose de moléculas adjacentes). O primeiro tipo de interação é responsável por certa rigidez das cadeias unitárias, e o segundo pela formação da fibra vegetal.

A estrutura da celulose é formada por duas fases, uma cristalina (ordenada) e uma amorfa (desordenada). Essas regiões não possuem fronteiras bem definidas, mas parece haver uma transição de um arranjo ordenado das cadeias de celulose para um estado desordenado ou amorfo, no qual estas cadeias apresentam uma orientação menor. Na região cristalina a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação. Na região amorfa a fibra tem maior flexibilidade. A cristalinidade pode ser estudada por varias técnicas, como por exemplo, raios-X, espectroscopia no infravermelho, Raman e outros (Fengel e Wagener, 1984; Laureano-Perez et al., 2005; A.T.W.M. Hendriks e G. Zeeman, 2009).

2.2.2. Lignina

Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas. Ela está presente principalmente na lamela média e na parede secundária. A lignina é a substância que confere rigidez à parede das células.

A distribuição da lignina nas células e nas plantas não é uniforme, assim como sua constituição em cada espécie não é a mesma. Devido ao fato de a lignina apresentar muitas variações (dependentes da espécie da planta, da parte da planta em que se encontra, da época do ano em que é sintetizada, do solo, do clima e outros) e a grande dificuldade de se isolar a macromolécula sem que esta sofra alterações em sua estrutura original (degradação, condensação) não é possível formular sua estrutura química.

Geralmente, é um polímero natural formado basicamente por unidades fenilproprano, ligadas entre si em diversas posições. A biossíntese da lignina ocorre através da polimerização radical dos seus precursores: alcoóis sinapílico, coniferílico e para-cumarílico (Souza, 1994).

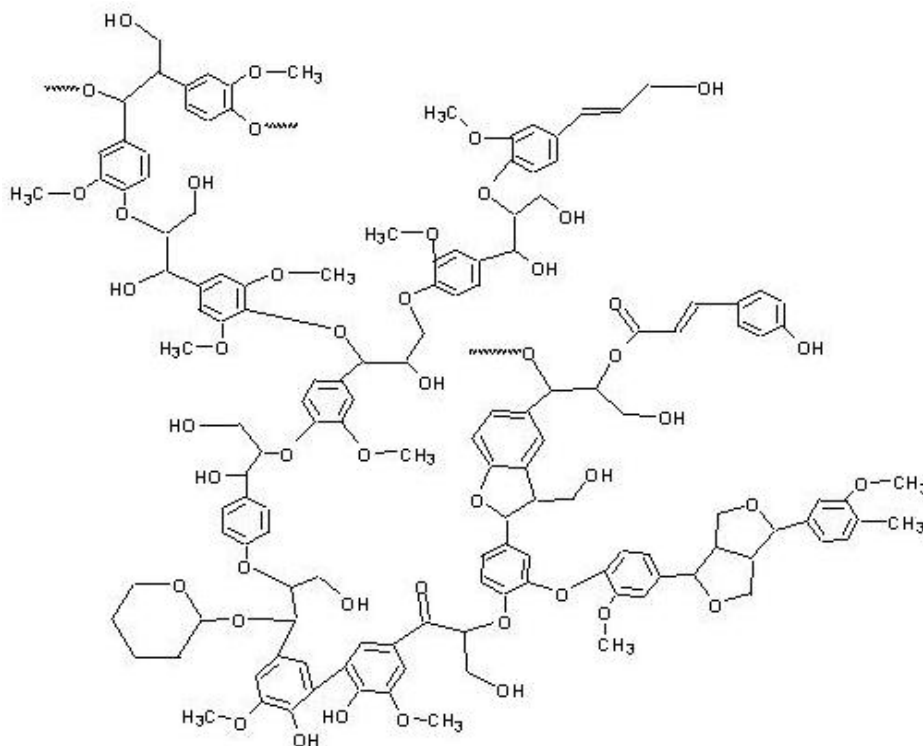


Figura 2.4. Estrutura geral da lignina. (American Chemical Society, 2000).

Existe uma classificação para as diferentes ligninas de acordo com a abundância de seus precursores: a lignina guaiacil, que ocorre em quase todas as madeiras moles (softwood), é produzida pela polimerização do álcool coniferílico; a lignina guaiacil-siringil, típica de madeiras duras (hardwood) é um copolímero dos alcoóis sinapílico e coniferílico; a lignina siringil-guaiacil-p-cumaril, formada a partir dos alcoóis sinapílico, coniferílico e p-hidroxi-cumarílico, é comumente encontrada em gramíneas como a cana-de-açúcar (Fengel e Wagener, 1984; Grabber, 2005).

2.2.3. Hemicelulose

Outro constituinte das plantas são as polioses ou hemiceluloses, que não constituem uma única substância, mas sim, uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, os quais estão associados com celulose e a lignina. As unidades de açúcares que formam as polioses podem ser subdivididas em grupos, tais como: pentoses, hexoses e deoxihexoses e ácidos hexurônicos (Saha, et al, 2003).

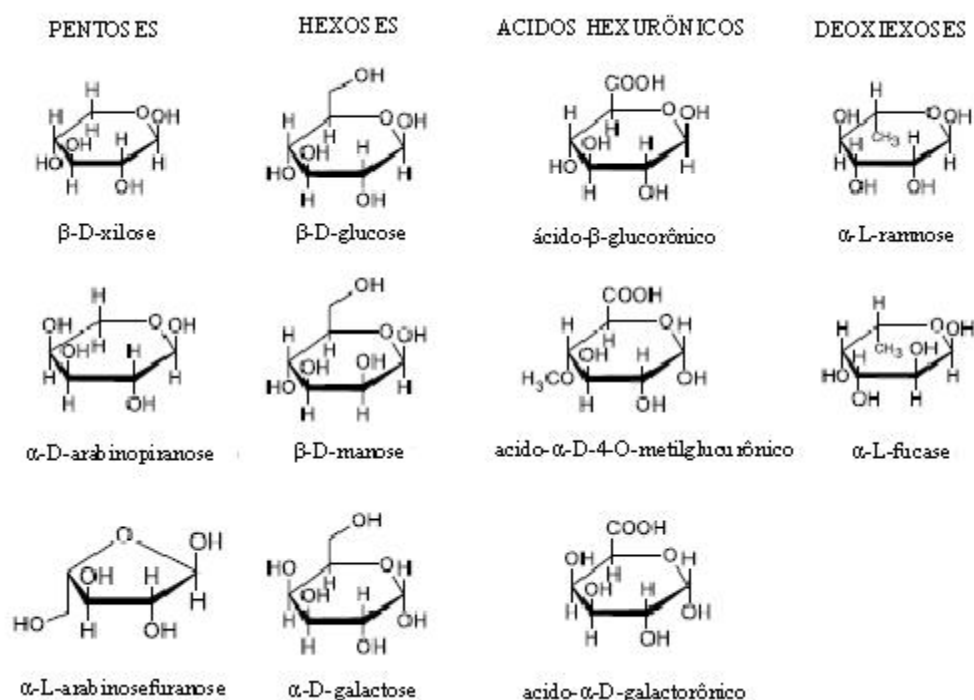


Figura 2.5. Unidades de açúcares que compõem as polioses. (Fengel e Wagener, 1984).

Apesar de serem ambas constituídas por açúcares, existem importantes diferenças de comportamento reacional entre as polioses e a celulose, devido, principalmente, à estrutura física. As polioses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Embora não haja evidências de que a celulose e as polioses estejam ligadas quimicamente, os pontes de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas tornam a sua separação quantitativa impossível. A presença das polioses junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o entumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (Weast, 1986).

2.2.4. Constituintes menores

Os constituintes menores dos materiais lignocelulósicos incluem compostos orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos pertencem a diferentes classes de compostos como ácidos graxos, ésteres, alcoóis, esteróides, hidrocarbonetos de elevada massa molecular e outros. Esses compostos são responsáveis pelas diversas características das plantas, tais como cor, cheiro, sabor, resistência ao apodrecimento e outros. Sua quantidade e composição relativa dependem de diversos fatores como espécie, idade da planta e região de ocorrência.

Os compostos orgânicos solúveis (em solventes orgânicos ou em água) ou volatilizados a vapor são normalmente denominados extraíveis. Os extraíveis podem exercer vários tipos de influência na fabricação de pasta celulósica, tais como redução no rendimento (material com alto teor de extraíveis), aumento no consumo de reagentes (extraíveis que reagem com os agentes químicos do licor de cozimento), inibição da reação de deslignificação (impermeabilidade, solubilidade dos fragmentos de lignina, decomposição do licor), corrosão de equipamento, diminuição da qualidade da polpa, dificuldade de recuperação do licor e incrustação.

Os compostos inorgânicos, chamados de cinzas, estão presentes em quantidades que variam de 1% a 10%. São constituídos principalmente de sulfatos, oxalatos, carbonatos, e silicatos de cálcio, potássio e magnésio, além de outros sais em quantidades menores. Possuem funções associadas com o sistema fisiológico, exercendo importante papel no metabolismo da planta (Bianchi, 1995).

2.3. Separação dos componentes da biomassa e sua transformação

Os componentes da biomassa precisam ser separados antes da sua transformação em produtos químicos. Primeiramente, devem ser separados os frutos, as sementes, as folhagens e a casca, e depois extraídos os óleos essenciais, vegetais e os carboidratos não-estruturais. Após esta separação temos o lenho propriamente dito que contém 20 a 25% de hemiceluloses, 25 a 30% de lignina e 45 a 55% de celulose.

A forma de separação mais utilizada industrialmente é a polpação química, através da qual se obtém a celulose para obtenção de polpa para papel e a lignina na forma solúvel, usada para gerar energia (Fengel e Wagener, 1984).

Uma parte das hemiceluloses é incorporada na polpa, outra parte é perdida. Na separação é necessária uma etapa de pré-tratamento, que pode ser feita através de processos químicos, físicos ou biológicos. Do material restante, pode ser separada ou a celulose, pela dissolução da lignina com álcali, ou a lignina pela hidrólise da celulose com ácidos fortes, ácidos diluídos ou enzimas. Na figura 2.6 encontra-se um esquema simplificado da separação dos componentes.

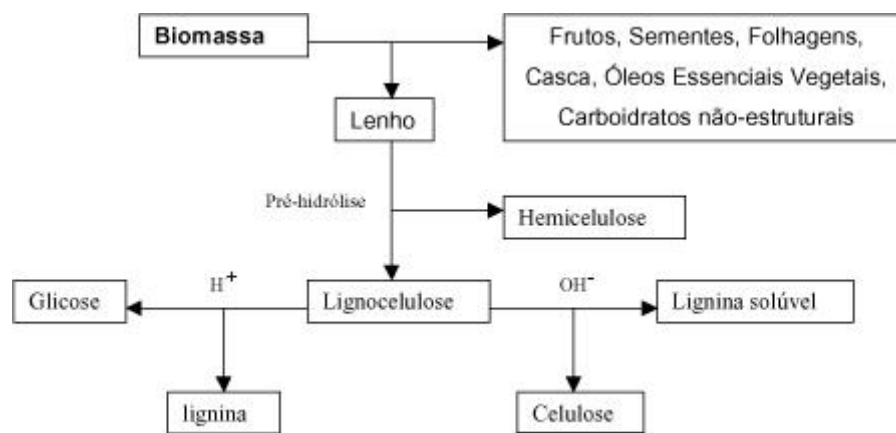


Figura 2.6. Esquema de separação dos componentes da biomassa. (Schuchardt et al., 2001).

A celulose já está sendo utilizada na produção de polpas celulósicas e na obtenção de fibras naturais como algodão, rayon e tencel. Para sua transformação em insumos

químicos é utilizada a glicose obtida pela sua hidrólise. Esta glicose pode ser fermentada para etanol, que então pode fornecer etileno, buteno (dimerização de etileno), propileno (metátese de buteno com etileno), butadieno (via acetaldeído) e ácido acrílico (via ácido láctico). Através de outros processos de fermentação pode-se ainda obter butanol, isopropanol, 2,3-butadienol, glicerol, acetona, ácido acético e ácido butírico. A hidrólise da glicose com ácidos diluídos leva ainda ao hidroximetilfurfural, que pode ser clivado em ácido levulínico e ácido fórmico. O ácido levulínico pode ser um interessante insumo para poliésteres.

Se as hemiceluloses forem separadas por explosão a vapor (tratamento com vapor saturado e despressurização rápida), obtém-se furfural como produto principal, que forma resinas com fenol ou uréia, ou pode ser hidrolisado para ácido maleico (Harris, 1975). Pode-se ainda produzir, por hidrogenação catalítica, xilitol (umectante, adoçante, plastificante, aditivo de alimentos) a partir de xilose, manitol (adoçante, plastificante, secante) a partir de manose, e um grande número de outros produtos de utilização já garantida (Melaja, et al., 1977).

As ligninas são mais hidrofóbicas e podem ser transformadas em óleos com características semelhantes ao petróleo através da hidrogenólise (Costa, 1989). Processos pirolíticos, que fornecem fenol e ácido acético como produtos principais, são provavelmente mais interessantes para a indústria química. Processos oxidativos também fornecem fenol, vanilina e lignina oxidada como produtos principais. Ligninas podem ainda ser utilizadas com vantagem na produção de resinas fenol-formaldeído. Ligninas também são adequadas para gaseificação com oxigênio, fornecendo gás de síntese, que é essencial na produção de metanol, que pode ser utilizado como composto chave para a produção de uma grande variedade de produtos químicos (Gonçalves, 1995).

2.4. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, que perfilha de maneira abundante, na fase inicial do desenvolvimento. Quando se estabelece como cultura, o autosombreamento induz inibição do perfilamento e aceleração do colmo principal. O crescimento em altura continua até a ocorrência de alguma limitação no suprimento da

água, à ocorrência de baixas temperaturas ou ainda devido ao florescimento, sendo este processo indesejável em culturas comerciais (Rodrigues, 1995).

As características varietais definem o número de colmos por planta, a altura e o diâmetro do colmo, o comprimento e a largura das folhas e a arquitetura da parte aérea, sendo a expressão destes caracteres muito influenciados pelo clima, pelo manejo e pelas práticas culturais utilizadas.

O rendimento econômico da cana-de-açúcar é dado pela produção de sacarose (o componente mais valioso), além de açúcares não redutores utilizados para formar o melaço e também a fibra, que pode ser utilizada como fonte de energia para usinas. O processamento industrial da cana pode também ser dirigido para a produção de álcool, para utilização como combustível e a partir daí, toda a álcoolquímica. Os processos de bioconversão de energia na cana-de-açúcar são mais efetivamente afetados pelos seguintes parâmetros ambientais: luz (intensidade e quantidade), concentração de CO₂, disponibilidade de água e nutrientes e temperatura. A temperatura, dos fatores climáticos, é o mais importante para a produção de cana-de-açúcar.

A planta, geralmente, é tolerante a altas temperaturas, produzindo em regiões com temperatura média de verão de 37°C, desde que empregada a irrigação. Temperaturas mais baixas (menos de 21°C) diminuem o crescimento dos colmos e promovem o acúmulo de sacarose (Rodrigues, 1995).

2.4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

Bagaço é o resíduo lignocelulósico fibroso do colmo de cana-de-açúcar produzido após moagem e extração do caldo, formado por um conjunto heterogêneo de partículas que dependem fundamentalmente dos equipamentos de preparação da cana e, em menor grau, dos moinhos e da variedade da cana-de-açúcar (Sarmiento, 1996).

O bagaço de cana-de-açúcar é composto, principalmente, de fibras (25 a 43%), água (46-52%) e pequenas quantidades de sólidos solúveis (sacarose, cera) e não solúveis (terra, pedras), estes num total de 2 a 6%. Sua composição é variável em

função da variedade de cana empregada, seu grau de maturidade, método de colheita utilizado e eficiência do processo industrial.

Os diferentes elementos morfológicos do bagaço de cana-de-açúcar apresentam-se na proporção seguinte (base seca limpa):

- Fibras longas da polpa: 50%
- Parênquima: 30%
- Vasos fibrovasculares: 15%
- Células epidérmicas: 5%

A polpa, composta de fibras muito lignificadas tem como função principal, sustentar a planta. No seu interior encontra-se o tecido parenquimatoso, cuja função é armazenar o suco açucarado, sendo que, dentro deste tecido, aparecem os vãos fibrovasculares compostos por fibras e vasos que, conjuntamente, cumprem a função de sustentar e conduzir os alimentos e produtos elaborados ao longo das folhas da planta. A epiderme, capa fina que recobre a cana, atua como camada impermeabilizante, e contém abundantes componentes não fundamentais da cana, quimicamente classificados como extrativos.

Ao ser moída a cana, este ordenamento anatômico é perdido, desde o ponto de vista estrutural, confundido-se as diferentes partículas. Ao agrupamento das fibras da polpa e das fibras curtas do seu interior, numa fração só, denomina-se fibra ou fibra útil, restando uma segunda fração formada pela medula e uma terceira, pelos finos (terra e solúveis). Estas duas últimas frações são conhecidas, indistintamente como, medula.

O conteúdo do bagaço integral, em base seca, é aproximadamente o seguinte:

- Fibra: 55-60%
- Medula: 30-35%
- Finos, terras e solúveis: 10-15%

A densidade e umidade do bagaço são as duas características físicas mais importantes relacionadas com os processos de utilização industrial (Geplacea, 1990).

O bagaço é um material constituído por fibras com espaços vazios entre elas, além dos poros e do lúmen. A massa específica aparente do bagaço de cana-de-açúcar, que depende de vários fatores, dentre os quais o mais importante é o grau de compactação do material e a umidade. A umidade do bagaço está em relação direta com o alto nível higroscópico da medula, assim como a porosidade das partículas, daí a grande capacidade de absorção (80-85% de umidade); a umidade de equilíbrio média do bagaço está situada entre 9 e 10% (Sarmiento, 1996).

2.5. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos

Para superar os problemas de susceptibilidade ao ataque enzimático, os resíduos lignocelulósicos são submetidos a processos de pré-tratamento, visando aumentar sua bioconversão. Estes problemas estão ligados às características estruturais da celulose como são: grau de inchamento da fibra com água, grau de cristalinidade, ordenamento molecular, presença de lignina e estrutura capilar da fibra da celulose.

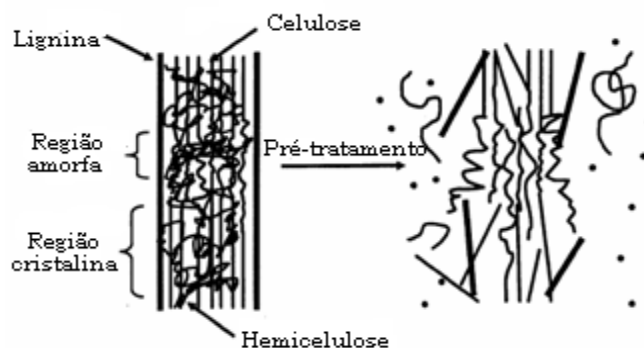


Figura 2.7. Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por Hsu et al., 1980).

Um pré-tratamento efetivo deveria romper a estrutura cristalina, provocar uma mudança na área superficial da fibra de celulose, diminuir a associação protetora da lignina e manter a estrutura capilar na fibra, como é mostrado na Figura 2.7.

Estes pré-tratamentos podem ser processos físicos, biológicos, químicos ou combinações deles. A susceptibilidade biológica da celulose aumenta quando o índice de cristalinidade diminui. A celulose é sacarificada rapidamente no caso em que o índice de cristalinidade é menor que 1,0 (Gomes, 1985).

O pré-tratamento foi visto como uma das etapas do processo mais caras na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. Por isso, esta etapa apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento (Lee et al., 1994; Lynd et al.; 1996; Mosier et al., 2003a, b).

2.5.1. Tipos de Pré-tratamento

Um pré-tratamento é considerado bom se a acessibilidade ao ataque biológico, isto é, das enzimas, é maximizada e a formação dos co-produtos inibidores é minimizada.

Existem vários tipos de pré-tratamento que podem ser usados para aumentar a susceptibilidade da associação celulose-lignina e assim melhorar a hidrólise enzimática. Os processos físicos, em geral, são utilizados para reduzir o grau de cristalinidade, diminuir o grau de polimerização, aumentar a fração solúvel em água e reduzir o tamanho das partículas (Dunlap et al., 1976). O uso de temperaturas na faixa de 150-200°C leva ao aumento da bioconversão dos materiais lignocelulósicos porque se produz um aumento do tamanho dos poros da fibra e o umedecimento do material, permitindo um melhor acesso das enzimas à celulose (Datta, 1981).

Os pré-tratamentos químicos têm recebido uma maior atenção, já que os pré-tratamentos físicos são relativamente ineficientes no aumento da digestibilidade da biomassa (FAN et al., 1982) e os tratamentos combinados raramente têm digestibilidade melhorada quando comparados aos tratamentos simples (Gharpuray et al., 1983). Assim, o pré-tratamento químico foi escolhido como objeto de estudo para este trabalho.

Num pré-tratamento biológico, geralmente é usado o bolor branco (*Pleurotus*, *Pycnoporus*, *Ischnoderma*, *Phlebia*, etc.), que causa a deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose (Rolz et al., 1986; Meshartree et al., 1987).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com SO₂ gasoso, na presença de vapor, tem levado a um substancial aumento na bioconversão destes materiais. Este processo solubiliza a lignina deixando a estrutura do material mais aberta ao ataque enzimático. Seu uso está limitado por um problema de poluição similar ao que ocorre na indústria de papel. (Datta, 1981; Dunlap et al., 1976).

Na tabela 2.1 pode-se observar um resumo dos métodos de pré-tratamentos mais estudados.

Tabela 2.1. Métodos de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos.

Método	Observações	Referencia bibliográfica
<u>Pré-tratamentos</u>		
<u>Físicos</u>		
Pulverizado Mecânico, Pirólise	Moinhos: vibratório, de bolas, de facas o martelo. Formação de produtos voláteis e carbono	SUN e CHENG, 2002; YU e ZHANG, 2003.
<u>Pré-tratamentos</u>		
<u>Físico-químicos</u>		
Explosão a vapor, Água líquida quente, Explosão de fibra com amoníaco, Explosão com CO ₂	Altas concentrações de sólidos. Hidrólise do 80-100% da hemicelulose. Concentrações de sólidos <20%. Requer-se recuperação de amoníaco, não produz inibidores.	SUN e CHENG, 2002; KAAR <i>et al.</i> , 1998; LYND, 1996; LASER <i>et al.</i> , 2002; LYND <i>et al.</i> , 2002; SUN e CHENG, 2002; DALE <i>et al.</i> , 1996.
<u>Pré-tratamentos</u>		
<u>Químicos</u>		
Ozonólise, Hidrólise com ácido diluído, Hidrólise alcalina, Deslignificação oxidativa, Processo	Conversão a glicose durante a hidrólise da celulose >75%. Não forma compostos inibitórios. Degradação principalmente da	SUN e CHENG, 2002; SCHELL <i>et al.</i> , 2003; RIVERS e EMERT, 1988; REZZOUG e CAPART,

organosolv.	lignina.	1996; LYND <i>et al.</i> , 2002.
	Altas conversões de xilana a xilose. Remoção da lignina 24-55%. Hidrólise de >50% da hemicelulose.	

Pré-tratamento Biológico

Bolor branco (<i>Pleurotus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Ischnoderma</i> , <i>Phlebia</i> , etc.).	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose.	ROLZ <i>et al.</i> (1986), MESHARTREE <i>et al</i> (1987)
--	--	---

Origem: SANCHES, 2005.

2.5.1.1. Pré-tratamento com Ácido Diluído

O ácido sulfúrico é misturado com a biomassa para hidrolisar a xilose e outros açúcares. O ácido sulfúrico tem sido aplicado inicialmente para remover a hemicelulose e quebrar a celulose em glicose ou fazer hidrólise ácida da celulose (Faith e Hall, 1945; Sherrard e Kressman, 1945; Harris et al., 1945; Faith, 1945; Harris e Beligner, 1946). As metodologias mais usadas e testadas são baseadas no ácido sulfúrico (GROHMANN et al., 1985; Torget et al., 1992; Nguyen et al., 2000), embora tenham sido testados o ácido nítrico (Brink, 1993, 1994), o ácido clorídrico (Israilides et al., 1978; Goldstein e Easter, 1992), e o ácido fosfórico (Israilides et al., 1978).

A hidrólise ácida libera oligômeros e monossacarídeos e historicamente tem sido modelada como uma reação homogênea na qual os ácidos catalisam o quebramento da celulose a glicose, seguido pelo rompimento da glicose liberada para formar hidroximetilfurfural e outros produtos de degradação (Seamen, 1945).

O ácido sulfúrico tem algumas limitações importantes incluindo a corrosão que exige materiais de construção caros. A formação dos produtos de degradação e liberação de inibidores na fermentação da biomassa são outras características do pré-tratamento ácido. O ácido fosfórico é um método seguro, econômico e eficiente para ser tomado como pré-tratamento da estrutura cristalina da celulose, que pode também ser

fácilmente reciclado e reutilizado. Portanto, o ácido fosfórico é um agente potencial para a decomposição altamente eficiente da celulose cristalina para gerar maior produtividade de açúcares fermentáveis hidrólise enzimática (Um et al, 2003).

2.5.2. Reações químicas durante o pré-tratamento

Ácidos e bases catalisam as reações de degradação da madeira, dissolvendo seus componentes. Dependendo dos tipos de reações de degradação de cada componente, poderia ser possível desenvolver pré-tratamentos mais eficazes e reduzir ao mínimo a degradação dos produtos (Holtzaple, 1985).

2.5.2.1. Degradação da celulose

A degradação ácida da celulose e glicose tem sido estudada por mais de 100 anos. O ácido fórmico, ácido levulínico e resinas foram produzidos a partir da degradação ácida da glicose (Von Grote e Tollens, 1874).

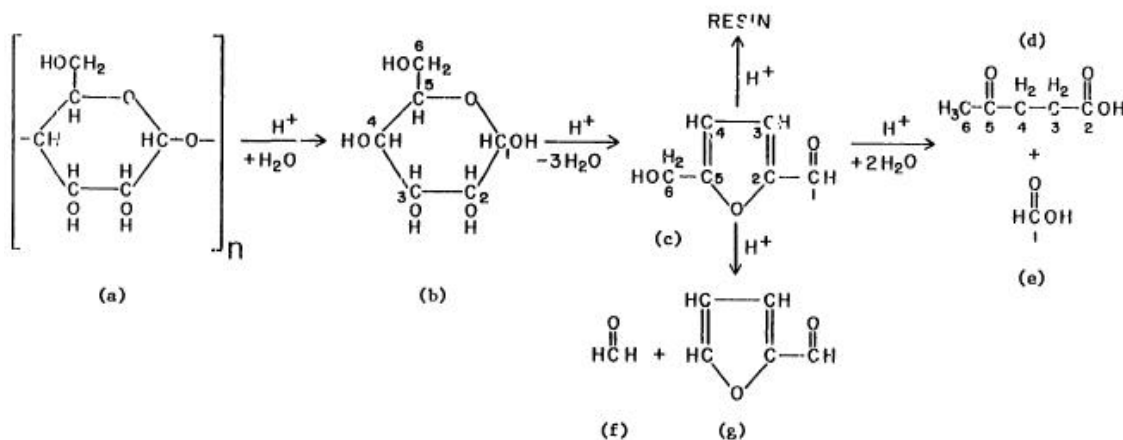


Figura 2.8. Degradação ácida da celulose (Holtzaple, 1985).

A Figura 2.8 mostra a via da degradação ácida da celulose. A celulose (a) é hidrolisada aleatoriamente dentro do polímero para formar glicose solúvel (b). Três moléculas de água são perdidas para transformar a glicose em 5-hidroximetilfurfural (c).

Existem três caminhos possíveis para a degradação do 5-hidroximetilfurfural. Um deles é polimerizá-lo a uma resina de cor marrom de estrutura desconhecida. Outro é dividir o 5-hidroximetilfurfural para formar ácido levulínico (d) e ácido fórmico (e). Existe uma terceira via para a degradação do hidroximetilfurfural, mas ocorre só a concentrações ácidas fortes ($\sim 15\text{M H}_2\text{SO}_4$). O formaldeído (f) é clivado ao 5-hidroximetilfurfural resultando em furfural (g).

Esta reação tem sido explorada como uma medida das hexoses totais. O formaldeído é produzido a partir do carbono-6 das hexoses. Devido a este carbono estar ausente nas pentoses, este método de análise de açúcares é seletivo para hexoses (Holtzaple, 1985).

2.5.2.2. Degradação da hemicelulose

Como a xilose é o componente dominante das hemiceluloses, só a degradação da xilose será discutida.

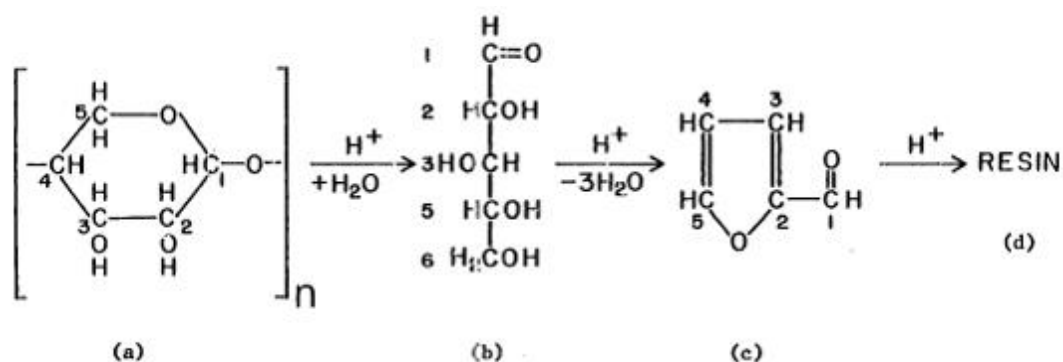


Figura 2.9. Degradação da hemicelulose (Holtzaple, 1985).

A Figura 2.9 mostra que a degradação ácida da xilana é em linha reta. A xilana (a) é hidrolisada a xilose (b) por via ácida. Com a perda de três moléculas de água, a xilose degrada-se em furfural (c). Isto pode ser conseguido com rendimentos consideráveis e constitui a base para as medições das pentoses. Se as condições da hidrólise são muito duras, o furfural faz uma resina (d) (Holtzaple, 1985).

2.5.2.3. Degradação da lignina

O objetivo da deslignificação é tornar a lignina solúvel mediante o quebramento das ligações da lignina. As ligações da lignina podem ser quebradas por meio de muitos tipos de reagentes incluindo bases, ácidos, halogênios, nitratos, oxidantes e redutores (particularmente hidrogênio).

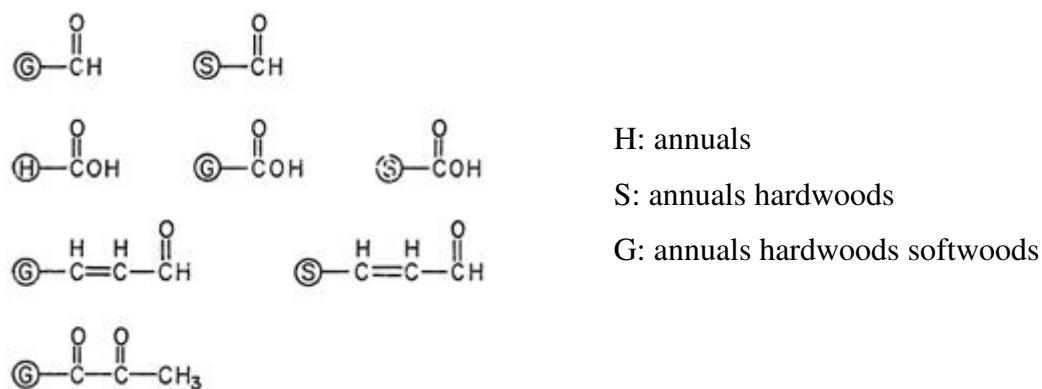


Figura 2.10. Produtos de degradação da lignina de madeira Aspen pré-tratado com vapor (Stanek, 1958).

A degradação ácida da lignina pode ocorrer mesmo quando não é adicionado ácido no reator. Só o vapor é capaz de liberar ácidos no interior da biomassa, que pode diminuir o pH para 3,5-4,0. Stanek (1958) isolou os componentes presentes na Figura 2.10 após 2 horas e com vapor de 170 °C.

A reação mais importante da lignina catalisada por ácido envolve a hidrólise das ligações α e β . A Figura 2.11 mostra os tipos de ligações mais comuns entre os monômeros da lignina.

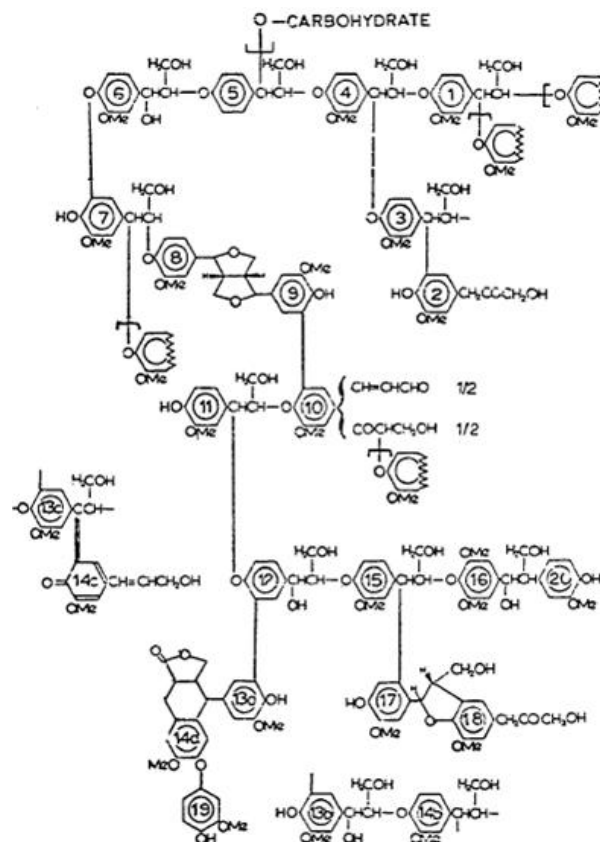


Figura 2.11. Estrutura química da lignina (Sarkanen, 1971).

Analisando os componentes do modelo, Sakakibara (1966) mostrou que as ligações α são muito mais suscetíveis à separação. Se as condições são muito severas (altas temperaturas, tempos longos e concentrações ácidas altas) a lignina solúvel pode repolimerizar-se para formar produtos de condensação. Estes produtos são considerados indesejáveis porque eles são menos reativos e, portanto, não são subprodutos valiosos.

2.6. Hidrólise

A hidrólise é um método que permite o aproveitamento dos potenciais individuais dos três polímeros principais da biomassa, ao invés de provocar a conversão simultânea de todos eles. Sob condições apropriadas, a hidrólise de maneira seletiva oferece a possibilidade de conversão das hemiceluloses em monossacarídeos (principalmente xilose e manose) e da celulose em D-glicose. A lignina pode ser removida antes da hidrólise ou permanecer como resíduo da reação em função do método utilizado (Duarte, 1989).

A celulose apresenta na sua estrutura regiões cristalinas e amorfas. A proporção de material cristalino estima-se em 50-90% (Fan et al., 1980). A porção fácil de hidrolisar corresponde à parte amorfa e a parte cristalina é mais resistente. A água tem um profundo efeito sobre a estrutura da celulose, sendo a porção amorfa a mais afetada. A superfície específica da celulose aumenta drasticamente após umedecê-la e quando é submetida à secagem com ar, a sua estrutura é modificada notavelmente (Lee et al., 1980).

2.6.1. Tipos de hidrólises

A sacarificação dos resíduos lignocelulósicos pré-tratados pode realizar-se por ação de ácidos minerais ou enzimas celulíticas. No caso da hidrólise ácida, existem basicamente dois processos. Um utiliza ácidos concentrados para catalisar a sacarificação e o outro utiliza ácidos diluídos. A hidrólise ácida permite atuação seletiva inicial sobre a hemicelulose, heteropolissacarídeo ramificado de cadeia reduzida e amorfo, devido às diferenças estruturais com a celulose, homopolissacarídeo linear de cadeia muito longa e regiões cristalinas (Gomes, 1985).

Os processos de hidrólise com ácido diluído são operados em temperaturas elevadas, produzindo soluções de açúcar em concentração de 10 a 12% e rendimentos limitados a 50-60%. Embora rendimentos superiores sejam prováveis para reações com tempos reduzidos a temperaturas mais altas, há uma barreira de ordem operacional que é a falta de equipamentos de transferência de calor para aquecimento e resfriamento muito rápidos (Duarte, 1989).

Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas (<100°C). A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto. Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva a degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (Szengyel, 2000).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo muito estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias (que levariam à perda de rendimento), ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (Bastos, 2007). A cristalinidade da celulose, a proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornam este tipo de hidrólise um processo lento e pouco econômico. A estrutura capilar das fibras de celulose e a presença de metais diminuem a eficiência da hidrólise enzimática (Roberto et al, 2003; Canetti, 2004).

2.6.1.1. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática consiste em uma reação química catalizada por uma enzima na presença de água para quebrar uma molécula em duas outras moléculas. Um dos produtos da reação catalizada receberá um grupo OH^- e, o outro produto, um próton de hidrogênio que serão incorporados à suas estruturas químicas. A produção de etanol partindo de resíduos agrícolas, requer um processo intenso para liberar as estruturas poliméricas de açúcar presentes na celulose e na hemicelulose. A hidrólise enzimática tem recebido nos últimos anos a atenção de muitos pesquisadores, basicamente porque, sendo as enzimas catalisadores biológicos específicos, formam poucos subprodutos e os processos são realizados sob condições moderadas de temperatura (Araujo et al., 1980).

Ao contrário dos catalisadores comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo assim os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluente (Segel, 1975). No caso da hidrólise enzimática, a especificidade da enzima evita ainda que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (Conteiro, 1992).

O mecanismo mais aceito para a hidrólise enzimática descreve sinergismo de, pelo menos, três enzimas, que são as endoglucanases (β -1,4-D-glucan-glucanohidrolase), que hidrolisa a molécula de celulose nos centros não cristalinos; exoglucanases (β -1,4-D-glucan-celobiohidrolase) que formam celobiose partindo do fim

da molécula de celulose; e β -glucosidase ou celobiase (β -D-glicoside-glucohidrolase), que hidrolisa a celobiose e forma duas moléculas de glicose.

O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, e taxa de agitação. Conseqüentemente é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (Vallander e Eriksson, 1985; Knauf and Moniruzzaman, 2004.).

2.6.1.1.1. Classificação das enzimas celulolíticas

As enzimas celulolíticas estão sendo usadas em numerosas aplicações industriais. Sua utilidade na geração de açúcares fermentescíveis está se incrementando moderadamente. O maior uso industrial atual de enzimas celulolíticas é na indústria têxtil. Dados cinéticos deram informação indireta sobre o modo de ação das enzimas celulolíticas juntamente com importantes informações úteis para a modelagem da hidrólise da celulose por sistemas específicos de enzimas celulolíticas (Ishizaki et al., 1990).

As enzimas celulolíticas se classificam em três grupos principais: celobiohidrolases, endoglucanases e β -glicosidase. Conforme a hipótese prevalente, as celobiohidrolases (CBHs) atacam os extremos das cadeias dos polímeros de celulose para liberar a celobiose. A Endoglucanase (EGs) diminui o grau de polimerização da celulose atacando a região amorfa da celulose por um corte aleatório nas cadeias. A β -glicosidase completa o processo hidrolisando a celobiose em glicose (Mehaia et al, 1987).

2.6.1.1.2. Sistemas celulolíticos e sinergismo

Os sistemas celulolíticos requerem detalhamento dos três grupos de enzimas celulolíticas. Estas enzimas não só trabalham para acertar a hidrólise da celulose, mas também sinergisticamente. Três tipos de sinergismo têm sido identificados. O primeiro e mais claro é o endo-exo sinergismo. As endoglucanases (endo), por ruptura aleatória

geram mais extremos de cadeias para o ataque das celobiohidrolases (exo). O efeito de outros dois tipos de sinergismos, exo-exo e sinergismo intramolecular são mais discretos e têm sido descobertos através de investigações detalhadas com enzimas celulolíticas puras (Zhang *et al*, 1994).

O exo-exo sinergismo se refere ao efeito de duas enzimas atuando conjuntamente, em comparação com as suas atividades individuais. No sistema *T. reesei*, por exemplo, celobiohidrolase I e celobiohidrolase II atuam sinergisticamente. A celobiohidrolase I ataca o extremo redutor da cadeia celulósica enquanto a celobiohidrolase II ataca o extremo não redutor da cadeia (Chen *et al*, 1997).

O sinergismo intramolecular refere-se às atividades relativas à enzima absorvida ou não adsorvida e ao nível de adsorção do domínio catalítico e o domínio celulósico. Estudos limitados da separação das proteínas descobriram que muitas enzimas celulolíticas têm módulos independentes com diferentes funções (Wang *et al*, 1991).

2.7. Produção biotecnológica de etanol

Uma grande parte dos materiais com alto conteúdo em celulose que podem ser utilizados para produção de etanol gera-se como resíduos nos processos produtivos dos setores agrícola, florestal e industrial. Os resíduos agrícolas procedem de cultivos lenhosos e herbáceos e, entre outros, há que destacar os produzidos nos cultivos de cereal. Por sua vez, os resíduos de origem florestal procedem do tratamento silvícola e de melhora ou manutenção dos morros e massas florestais. Também podem utilizar-se resíduos gerados em algumas indústrias, como a de papel, a horta frutícola ou a fração orgânica de resíduos sólidos industriais. Muitos destes resíduos não só têm valor econômico no contexto onde se geram, mas também podem ser causa de problemas ambientais durante sua eliminação (Cabrera, 2006).

Bagaço de cana-de-açúcar é produzido em grande escala pelas indústrias de açúcar e álcool no Brasil (Martínez *et al.*, 2003; Hernández-Salas *et al.*, 2009), Índia (Martínez *et al.*, 2003; Chandel *et al.*, 2007), Cuba (Martínez *et al.*, 2003), China (Martínez *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2008), México (Hernández-Salas *et al.*, 2009), Indonésia (Restuti and Michaelowa, 2007) e Colômbia (Quintero *et al.*, 2008). Cerca de

50% deste resíduo é usado em destilarias como recurso de energia (Pandey et al., 2000). Por tanto, em virtude da importância do bagaço de cana-de-açúcar como um resíduo industrial, há um grande interesse no desenvolvimento de tecnologias para produção de combustíveis e químicos que oferecem vantagens econômicas e ambientais (Adsule et al., 2004).

O Brasil é conhecido por seu grande potencial de produção de recursos renováveis tais como produtos agrícolas, florestais e resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo, a casca de aveia e as aparas de madeira. A produção de resíduos agroindustriais é de aproximadamente 250 milhões de toneladas/ano. A utilização adequada destes resíduos ajuda a minimizar problemas ambientais e energéticos, além disso, pode gerar produtos com relevantes aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos (Roberto et al., 1995; Souza et al., 2002).

A produção de etanol combustível a partir do bagaço de cana-de-açúcar compreende basicamente a etapa de pré-tratamento e hidrólise do material, onde a celulose e a hemicelulose são primeiro convertidas a açúcares fermentescíveis, e uma etapa de fermentação onde ditos açúcares são fermentados para produzir etanol. Estes açúcares fermentescíveis incluem como principais componentes a glicose e a xilose (Drapcho et al., 2008).

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo será detalhada a metodologia experimental adotada neste trabalho. Aqui será exposto desde a caracterização da matéria-prima, até os procedimentos utilizados no pré-tratamento e na hidrólise enzimática.

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para os ensaios experimentais foram:

- Aparato Soxhlet modelo MA – 188 marca Marconi;
- Autoclave vertical modelo AV 50 marca Phoenix;
- Agitador magnético com aquecimento modelo MA-085 marca Marconi;
- Balança analítica marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,0001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Banho termostatzado modelo MA-184 de marca Marconi com precisão de $\pm 0,01$ °C;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) marca Waters;
- Difrátômetro Rigaku Co. DMAXX 2200 (versão 2.2) com tubo de cobre;
- Espectrofotômetro UV Mini-1240 Shimadzu com precisão na quarta casa decimal;
- Espectrofotômetro 600S Femton com precisão na terceira casa decimal;
- Estufa de secagem modelo MA-035/2 marca Marconi;
- Incubadora refrigerada com agitação (shaker) modelo MA-832 Marconi;
- Medidor de pH marca Marconi com precisão de 0,0;
- Moinho de faca modelo n° 3 marca Wiley Mill;
- Moinho de martelo marca General Electric;
- Mufla modelo Q-318D24 marca Quimis;
- Filtros de papel n° 1 da marca Whatman;
- Filtros CA para seringa com poros de $0,45 \mu\text{m}$ da marca Whatman;

- Seringa Hamilton 25 μ L.

3.1.2. Reagentes

Os reagentes utilizados para a determinação experimental foram:

- Água destilada;
- Água deionizada (utilizada como fase móvel nas análises em HPLC);
- Hidróxido de sódio da marca Nuclear com 95-100% de pureza;
- Kit Glicose God-Pap da marca Laborlab;
- Fenol da marca Vetec com 99% de pureza;
- Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado de marca Synth com 99% de pureza;
- Ácido dinitro-3,5-salicílico da marca Vetec com 99% de pureza;
- Ácido cítrico monohidratado da marca Dinâmica com 99,5% de pureza;
- Ácido clorídrico da marca Merck com 37% de pureza;
- Ácido sulfúrico da marca Merck com 95 - 98% de pureza;
- Ácido fosfórico da marca Smyth com 85% de pureza;
- Padrões: D-(+)-glicose da marca Merck com pureza $\geq 99\%$, D-(+) celobiose de marca Fluka, DL-xilose de marca Fluka, D-manose de marca Chem Service, DL-arabinose de marca Sigma;
- Enzima Celulase e β -glicosidase da marca Sigma;

3.2. Matéria-prima

3.2.1. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A matéria-prima para as análises foi bagaço de cana-de-açúcar resultante da última moenda, não-queimado, fornecido por meio de colheita mecanizada, da safra de outubro de 2007, proveniente da Usina da Pedra, localizada em Serrana, interior do estado de São Paulo. O bagaço foi seco por um período de quatro dias, moído em moinhos de facas Wiley Mill e de martelo General Electric. Posteriormente, foi peneirado usando peneira Tyler 35(em torno de 0,5 mm) para todas as análises.

armazenado em freezer em sacos plásticos hermeticamente fechados e identificados (Garcia, 2009).

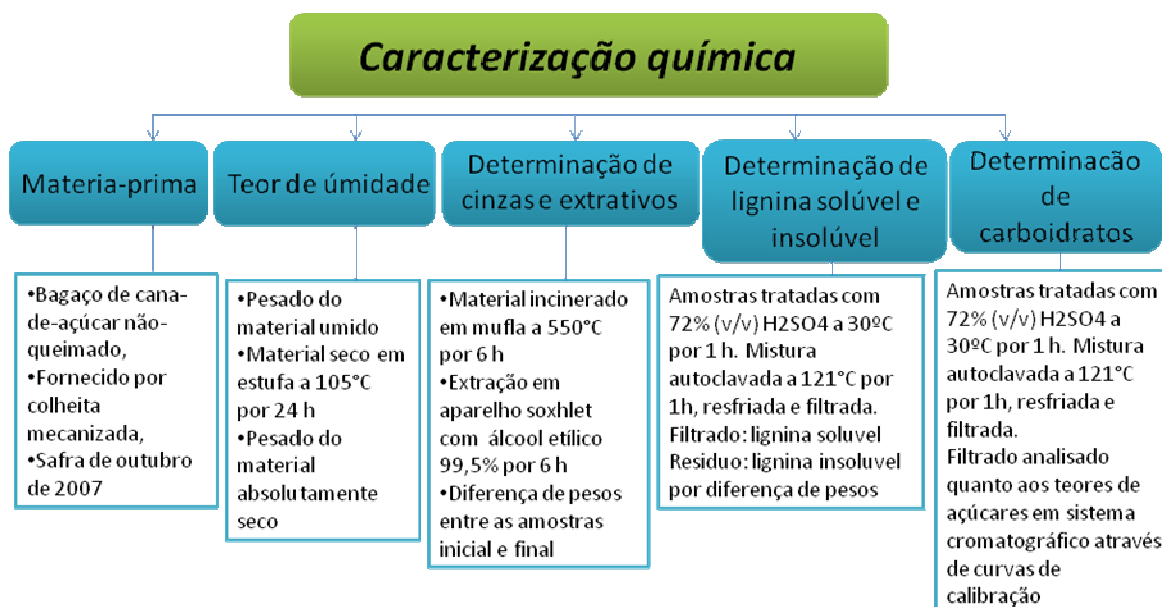


Figura 3.0. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

3.2.1.1. Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado coletando aliquotas do material e seco em estufa a 105°C por 24 h. Esta análise foi baseada na norma do NREL “Determination of Total Solids in Biomass” (SLUITER et al., 2005).

Para o cálculo do teor de umidade na amostra utilizou-se a Equação 1:

$$\% \text{ teor de umidade} = \frac{\text{massa do bagaço umido} - \text{massa do bagaço a.s.}}{\text{massa do bagaço umido}} \times 100 \quad (1)$$

Onde a.s. representa a massa absolutamente seca do material.

3.2.1.2. Determinação de cinzas e extrativos

Para a determinação do teor de cinzas, amostras em triplicata de 4 g de bagaço de cana-de-açúcar moído e peneirado foram lavadas, para que qualquer traço de areia fosse eliminado, e inseridas em mufla à uma temperatura de 550°C para que fossem

incineradas por aproximadamente 6 h. A diferença entre as amostras iniciais e finais forneceu o teor de cinzas.

Na determinação de extrativos, a metodologia foi baseada nas normas NREL nº.010 (2005) e na tese de Silva (1995). Foram consideradas amostras de 4 g do bagaço moído e não-peneirado. A extração foi realizada em aparelho soxhlet com 190 mL de álcool etílico 99,5% por 6 h. A análise foi feita em triplicata. Amostras finais e iniciais foram pesadas, subtraídas e, assim, o teor de extrativos foi determinado.

3.2.1.3. Determinação de lignina solúvel e insolúvel

Com as amostras livres de extrativos, fez-se a quantificação de lignina solúvel e insolúvel. O conteúdo de lignina foi medido segundo as metodologias NREL nº. 003 (1995) e nº. 004 (1996). Pesou-se 0,3 g destas amostras em tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado 3 mL de solução de H_2SO_4 72% (v/v) e foram colocados em banho ultratermostatizado com temperatura ajustada de 30°C por 1 h. Em seguida o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para um erlenmeyer de 250 mL com 84 mL de água. A mistura foi autoclavada a 121°C por 1h, resfriada e filtrada em papel filtro previamente secos a 105°C e pesados. A porção de lignina insolúvel foi obtida pela diferença entre o peso inicial e o resíduo ao término do processo. Com o filtrado gerado pelo processo, a porção solúvel foi quantificada em espectrofotômetro UV com leituras realizadas em 205 nm. Através da soma do teor de lignina solúvel e insolúvel obteve-se o conteúdo total de lignina.

3.2.1.4. Determinação de carboidratos

O teor de glucana e xilana foram determinados a partir da hidrólise do material com H_2SO_4 72%(v/v) segundo as metodologias NREL nº. 003 (1995) e nº. 004 (1996).. Cerca de 300 mg de amostra foram tratados com 3 mL de H_2SO_4 72% (p/p) por uma hora a 30°C. Em seguida o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para um erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 84 mL de água. A mistura foi autoclavada a 121°C por 1h, resfriada e filtrada em filtros previamente secos a 105°C e pesados. O filtrado foi analisado quanto aos teores de açúcares em um sistema cromatográfico. A análise cromatográfica foi realizada através de cromatografia líquida

de alta eficiência (CLAE). A concentração de açúcares foi determinada através de curvas de calibração preparadas com padrões de grau analítico.

3.3. Procedimentos experimentais

3.3.1. Pré-tratamento

Visando aumentar sua bioconversão e superar os problemas de susceptibilidade ao ataque enzimático, os resíduos lignocelulósicos foram submetidos a processos de pré-tratamento, com o objetivo de remover a lignina e a hemicelulose. Para isso foram verificadas como influenciam algumas variáveis tomando como resposta a concentração de glicose no final da reação de hidrólise.

No pre-tratamento foi analisado o tempo de reação, a concentração de ácido e a temperatura. Posteriormente foi feita uma deslignificação com hidróxido de sódio a temperatura, concentração e tempo fixos.

Amostras de aproximadamente 10,0 g de bagaço seco foram tratados com 100 mL da solução contendo ácido sulfúrico ou ácido fosfórico a uma concentração, tempo e temperatura determinada pelo planejamento. Ao término de cada uma das reações o líquido reacional foi descartado e os resíduos restantes lavados com água destilada. As amostras foram secas em estufa a uma temperatura de 50°C, pesadas em uma balança analítica e armazenadas na geladeira em potes plásticos identificados.

3.3.2. Atividade enzimática

3.3.2.1. Atividade da Celulase

A atividade da celulase foi determinada pelo método de Ghose (1987) como atividade de filtro de papel (Filter Paper Activity - FPA), sendo medida em unidades de papel por mililitro da solução original da enzima não diluída, como proposto no trabalho de Rabelo (2007). Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade de enzima celulase (FPU) é baseada na liberação de 2 mg de açúcar reduzido como glicose equivalente, ou seja, $2,0/0,18016 \mu\text{mol}$ de 50 mg de filtro de papel por 0,5 mL de

enzima diluída em uma reação com duração de 60 minutos. A Equação 2 foi utilizada para o cálculo da atividade da celulase (Ghose, 1987):

$$\frac{FPU}{mL} = \frac{20}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 [\text{fator de diluição da enzima}])} \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$$

(2)

$$\frac{FPU}{mL} = \frac{0,037}{[\text{fator de diluição da enzima}]}$$

3.3.2.2. Atividade da B-glicosidade

A atividade da β -glicosidase é medida utilizando-se de uma solução de celobiose 15 mmol/L e é expressa em unidades de celobiose (CBU). A unidade de atividade de β -glicosidase representa a liberação de, exatamente, 1 mg de glicose, ou seja, 0,5/0,1816 μ mol de celobiose convertida por 1 mL de enzima diluída em uma reação com duração de 30 minutos. Assim, tem-se a Equação 3 para calcular a atividade da β -glicosidase (Wood e Bhat, 1988; Rabelo 2007).

$$\frac{CBU}{mL} = \frac{0,5}{(0,18016 \times 1,0 \times 30 [\text{fator de diluição da enzima}])} \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$$

(3)

$$\frac{CBU}{mL} = \frac{0,0926}{[\text{fator de diluição da enzima}]}$$

3.3.3. Hidrólise enzimática

Aproximadamente 1,0 g de bagaço seco de cada ensaio foi pesado em erlenmeyers e 100 mL de água destilada foram adicionados e encubados em um shaker com rotação mantida a 100 rpm. O pH das amostras foi ajustado para o valor de pH ótimo da enzima, 4,8. A temperatura utilizada durante a hidrólise foi 50°C que corresponde ao valor encontrado para a temperatura ótima da enzima, onde sua atividade é máxima, segundo Rabelo 2007.

Amostras de aproximadamente 2 mL do líquido reacional da hidrólise enzimática foram coletas em períodos de tempo de 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h, fervidas por 15 minutos, em tubos identificados, para inativação das enzimas.

3.3.4. Determinação de açúcares

O filtrado da hidrólise enzimática foi analisado quanto aos teores de glicose, xilose, celobiose e arabinose em um sistema cromatográfico. A análise cromatográfica foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a concentração de açúcares foi determinada através de curvas de calibração preparadas com padrões de grau analítico.

3.4. Planejamento de experimentos

3.4.1. Pré-tratamento com ácido sulfúrico e ácido fosfórico diluídos

Pré-tratamentos com ácidos diluídos podem ser empregados a vários níveis com o fim de ajustar a estrutura do material para hidrólise enzimática. Estudos mostraram que a altas concentrações de ácido podem ser causados efeitos inibitórios que afetam a digestibilidade enzimática, o que resultaria em uma redução na produção de açúcares na sacarificação enzimática. Estudos mostram também que em temperaturas altas e tempos longos as fibras são queimadas pro o ácido ser um reagente muito corrosivo (Saha et al, 2005). Assim, as faixas das variáveis de estudo consideradas foram tempos curtos, concentrações de ácido baixas e temperaturas moderadas.

Uma revisão na literatura sobre biomassa lignocelulósica pré-tratada com ácido permitiu determinar as faixas de trabalho das variáveis de estudo. Foi feito um primeiro caso de estudo para avaliar só duas das três variáveis, e assim ter uma idéia da susceptibilidade do bagaço ao ácido sulfúrico, examinando uma ampla faixa de concentrações. Em seguida, foram realizados experimentos para avaliar as três variáveis de estudo com a finalidade de ter as melhores condições dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido fosfórico (H_3PO_4) diluídos.

3.4.2. Determinação da carga enzimática mínima para altos rendimentos

Neste estudo foi analisado o efeito da carga enzimática para a melhor condição o pré-tratamento selecionado com o objetivo de ter a carga enzimática mínima capaz de elevar a produção de açúcares fermentescíveis.

A concentração de sólidos foi fixada em 3% de bagaço pré-tratado nas melhores condições. As condições da hidrólise são como descritas no item 3.3.3. A cada ensaio foram adicionadas diferentes concentrações de celulase e β -glicosidase de acordo com um planejamento composto central 2^2 com três pontos centrais.. Alíquotas foram retiradas aos 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h. A quantificação dos açúcares foi realizada conforme o item 3.3.4.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSOES

4.1. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A umidade não é considerada um componente estrutural da biomassa e pode mudar com o armazenamento e manipulação. Por isso, é necessário determinar o teor de umidade para saber a quantidade de sólidos totais. O teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar usado em todas as análises foi de $5,12 \pm 0,6\%$.

Como pode ser visto na Tabela 4.0, o teor de extrativos foi de 3,25% que corresponde à quantidade de, taninos, pigmentos, alcalóides, óleos essenciais, resinas, graxas. O teor de cinzas foi de 1,79% que corresponde à quantidade de silicatos e sulfatos.

Tabela 4.0 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar (Garcia, 2009)

Componente	Porcentagem %
Extrativos	$3,25 \pm 0,2$
Cinzas	$1,79 \pm 0,02$
Lignina Total	$25,10 \pm 0,5$
Glucana	$37,35 \pm 0,5$
Xilana	$23,66 \pm 0,9$

Os teores de lignina solúvel e insolúvel e de açúcares provenientes da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foram determinadas em amostras livres de extrativos. A lignina solúvel é aquela que permanece no filtrado e a insolúvel é definida como aquele resíduo que não se solubiliza, dando um valor total de 25,10%. Os carboidratos encontrados no bagaço de cana-de-açúcar foram 37,35% de glucana e 23,66% de xilana (Garcia, 2009).

4.2. Planejamento 2² do pré-tratamento com ácido sulfúrico

Um dos ácidos mais usados para pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica é o ácido sulfúrico (Aguilar et al., 2002; Alves et al., 1998; Alves et al., 2002; Gong et al.,

1993; Neureiter et al., 2002). No entanto, outros ácidos como o H_3PO_4 (Gamez et al, 2006), HCl (Bustos, Ramírez, Garrote, & Vázquez, 2003) e HNO_3 (Rodríguez-Chong et al., 2004) também têm sido usados em processos de pré-tratamento.

Foi feito um primeiro estudo para avaliar uma ampla faixa de concentrações e tempos e assim ter uma idéia da susceptibilidade do bagaço ao ácido sulfúrico. A sacarificação foi feita com uma carga enzimática de celulase de 15 FPU/g de bagaço pré-tratado e de β -glicosidase de 7,5 CBU/g de bagaço pré-tratado. A temperatura do pré-tratamento foi mantida fixa em 121°C. Nesta seção a letra *a* denota a faixa de concentrações de ácido sulfúrico compreendidas entre 0,5%p/v - 3,5%p/v, e a letra *b* denota a faixa de concentrações de ácido sulfúrico compreendidas entre 5%p/v - 10%p/v. As tabelas 4.1a e 4.1b mostram as faixas de valores estudados.

Tabela 4.1a. Faixa de valores estudados no planejamento 2^2 do pré-tratamento com ácido sulfúrico

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Ácido (%p/v)	0,5	2	3,5
Tempo (min)	15	97,5	180

Tabela 4.1b. Faixa de valores estudados no planejamento 2^2 do pré-tratamento com ácido sulfúrico

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Ácido (%p/v)	5	7,5	10
Tempo (min)	15	97,5	180

Nas Tabelas 4.2a 4.2b são apresentadas a matrizes de planejamento 2^2 com 3 repetições no ponto central e suas combinações e respostas. Em todos os ensaios foram quantificadas as massas de glicose e ART liberadas na hidrólise enzimática. As respostas são expressas em g glicose/g bagaço sem pré-tratar e g ART/g bagaço sem pré-tratar. O rendimento da glicose na hidrólise enzimática foi calculado através da equação (4):

$$Rendimento\ glicose\ (\%) = \frac{g\ glucana\ hidrolisada}{g\ glucana\ no\ bagaço\ sem\ pré-tratar} = \frac{g\ glicose}{g\ glucana} \times \frac{162,2}{180,2} \times 100 \quad (4)$$

Tabela 4.2a. Matriz do planejamento 2² do pré-tratamento com ácido sulfúrico

Ensaio	tempo min	Ácido sulfúrico %p/v	Glicose (g/g bagaço sem pré-tratar)	ART (g/g bagaço sem pré-tratar)
1	15	0,5	0,0483	0,0686
2	180	0,5	0,0664	0,0844
3	15	3,5	0,0856	0,1178
4	180	3,5	0,0738	0,0876
5c	97,5	2	0,0653	0,0858
6c	97,5	2	0,0659	0,0870
7c	97,5	2	0,0660	0,0868

Na tabela 4.2a pode se ver que a maior produção de glicose se deu no ensaio 3 com um valor de 0,0856 g de glicose/g de bagaço sem pré-tratar a 3,5%p/v de ácido e 15 minutos. Já na tabela 4.2b a maior produção de glicose ocorreu no ensaio 2, com um valor de 0,0767 g/ g bagaço sem pré-tratar e um rendimento de 18,47%. Apesar do ensaio 3 ter a maior produção de glicose no planejamento, o rendimento foi de 20,61% o que pode ser atribuído, entre outros fatores, à baixa remoção da lignina.

Tabela 4.2b. Matriz do planejamento 2² do pré-tratamento com ácido sulfúrico

Ensaio	tempo min	Ácido sulfúrico %p/v	Glicose (g/g bagaço sem pré-tratar)	ART (g/g bagaço sem pré-tratar)
1	15	5	0,0735	0,1015
2	180	5	0,0767	0,0891
3	15	10	0,0550	0,0773
4	180	10	0,0549	0,0846
5c	97,5	7,5	0,0572	0,0692
6c	97,5	7,5	0,0563	0,0690
7c	97,5	7,5	0,0566	0,0685

As Figuras 4.1a e 4.1b mostram as percentagens de massas solubilizadas no pré-tratamento de 10g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1 g de bagaço pré-tratado, de cada um dos ensaios dos planejamentos. Na figura 4.1a pode ser visto que no ensaio 3 houve uma perda de massa de 13,65% no pré-tratamento e 20,20% de massa hidrolisada. O segundo melhor ensaio em termos de rendimento em glicose foi o 4 apresentando 44,76% de massa solubilizada durante o pré-tratamento e 15,44% de massa hidrolisada.

Já para na figura 4.1b nota-se que ensaio 2 teve uma perda de massa de 46,83% e 21,68% de massa hidrolisada, sendo o ensaio que apresentou a maior porcentagem de massa hidrolisada.

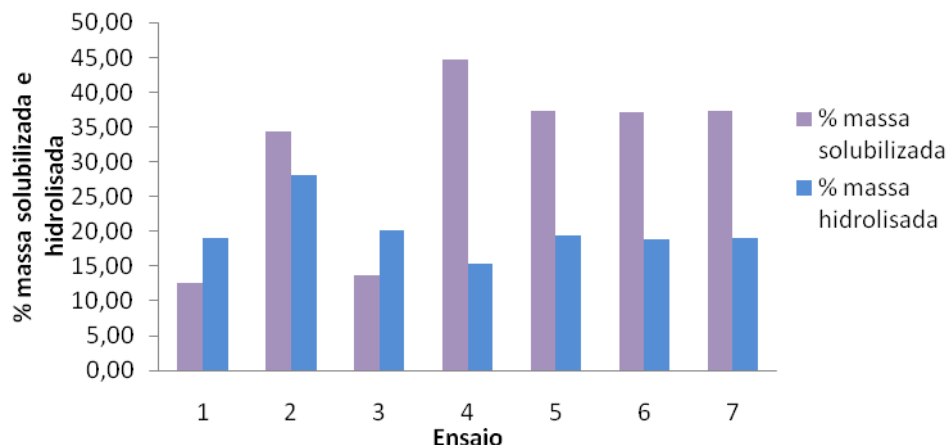


Figura 4.1a. Massa de bagaço solubilizada após o pré-tratamento e hidrolisada

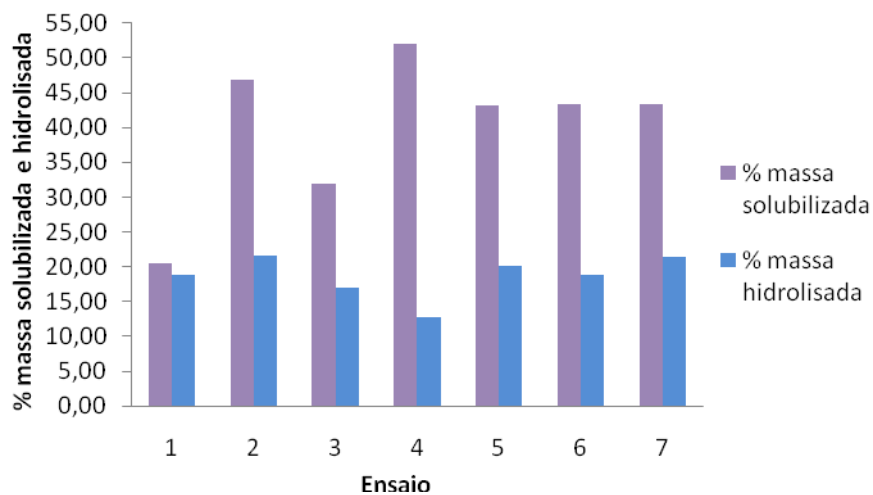


Figura 4.1b. Massa de bagaço solubilizada após o pré-tratamento e hidrolisada

A relativa perda de massa no pré-tratamento com ácido sulfúrico pode ser atribuída ao fato de o ácido ser um reagente apropriado para a remoção da hemicelulose. Para comprovar estas hipóteses, no seguinte item será exposta a composição do bagaço e o balanço de massa após cada um dos ensaios nos dois planejamentos.

4.2.1. Análise composicional no Pré-tratamento com ácido sulfúrico

De acordo com a metodologia descrita no item 3.2, foi feita a caracterização do bagaço obtido em cada ensaio após o pré-tratamento. As tabelas 4.3a e 4.3b mostram a composição do bagaço antes e depois do pré-tratamento.

Quando comparamos a tabela 4.3a com a tabela 4.2a, nota-se que no ensaio 3, o qual teve a maior produção de glicose, foi onde houve maior remoção de lignina, ficando assim no bagaço 11,56%. Esse 11,56% de lignina restantes no bagaço prejudicaram o rendimento da hidrólise enzimática. A lignina ainda presente no bagaço pode impor restrições estruturais sobre a celulase, já que é uma ligação improdutiva que retarda o ataque enzimático. O segundo ensaio com maior liberação de glicose foi o ensaio 4, que resultou no bagaço pré-tratado com maior porcentagem de lignina e menor porcentagem de xilana, o que indica que tanto a remoção de lignina quanto a de hemicelulose favorecem a hidrólise enzimática.

Tabela 4.3a. Composição do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico

Ensaio	% glucana antes	% glucana depois	% xilana antes	% xilana depois	% lignina total antes	% lignina total depois
1	37,35	45,22	23,66	26,57	25,10	12,34
2	37,35	49,69	23,66	19,61	25,10	16,69
3	37,35	47,82	23,66	24,83	25,10	11,56
4	37,35	50,94	23,66	12,04	25,10	19,75
5c	37,35	49,85	23,66	19,76	25,10	14,32
6c	37,35	49,84	23,66	19,89	25,10	14,40
7c	37,35	49,40	23,66	19,64	25,10	14,31

Avaliando a tabela 4.4a, pode-se perceber que em todos os ensaios houve perda de uma fração de celulose, o que é indesejável. Os ensaios com menores perdas foram os ensaios 1 e 3, onde os pré-tratamentos foram realizados por menor tempo. Passando do nível inferior do tempo para o superior nota-se claramente a perda de glucana. Comparando os ensaios 1 e 2 e os ensaios 3 e 4 demonstra-se que o tempo influencia mais do que a concentração de ácido na perda de glucana.

Tabela 4.3b. Composição do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico

Ensaio	%glucana antes	%glucana depois	%xilana antes	%xilana depois	%lignina total antes	%lignina total depois
1	37,35	46,26	23,66	23,54	25,10	14,06
2	37,35	63,56	23,66	8,72	25,10	13,37
3	37,35	45,26	23,66	19,15	25,10	16,06
4	37,35	60,57	23,66	1,49	25,10	24,01
5c	37,35	56,78	23,66	12,45	25,10	9,99
6c	37,35	56,52	23,66	12,35	25,10	9,84
7c	37,35	56,90	23,66	12,45	25,10	10,11

O ensaio 4 da tabela 4.2b se comparado com a figura 4.1b, apresentou maior massa solubilizada e menor massa hidrolisada, mas a menor produção de glicose, o que pode ser explicado com o balanço de massa da tabela 4.4b. Foi o ensaio 4 quem ficou com mais lignina e menos xilana no bagaço depois do pré-tratamento. Além disso, observando-se a tabela 4.4b, note-se que neste ensaio houve a maior perda de glucana, seguido do ensaio 3. Os ensaios 3 e 4 foram realizados com a maior concentração de ácido sulfúrico. O ensaio 2 da tabela 4.2b apresentou a maior produção de glicose na hidrólise enzimática, e uma quantidade elevada de massa solubilizada e massa hidrolisada (Figura 4.1b). Neste ensaio houve grande remoção de xilana e de lignina, ficando no bagaço pré-tratado 13,37% de lignina total (tabela 4.3b). A remoção de xilana pode expor grandemente a estrutura da celulose e incrementar a fração solúvel de glucana, mas a lignina ainda presente desativa a função do complexo enzimático na hidrólise. Este ensaio foi o que levou à menor perda de celulose, o que pode ser visto na tabela 4.4b, onde a quantidade de glucana no bagaço pré-tratado é a maior de todos os ensaios.

Tabela 4.4a. Balanço de massa do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico

Ensaio	glucana antes g	glucana depois g	xilana antes g	xilana depois g	lignina total antes g	lignina total depois g	Massa antes do Pto g	Massa após Pto g
1	37,35	33,40	23,66	23,23	25,10	10,79	100	80,41
2	37,35	29,97	23,66	12,21	25,10	8,98	100	62,59
3	37,35	32,69	23,66	19,77	25,10	9,98	100	76,15
4	37,35	28,14	23,66	6,65	25,10	10,91	100	55,24
5c	37,35	30,65	23,66	10,96	25,10	8,99	100	62,75
6c	37,35	30,74	23,66	11,23	25,10	9,06	100	62,93
7c	37,35	30,35	23,66	11,08	25,10	8,97	100	62,70

Tabela 4.4b. Balanço de massa do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico

Ensaio	glucana antes g	glucana depois g	xilana antes g	xilana depois g	lignina total antes g	lignina total depois g	Massa antes do Pto g	Massa após Pto g
1	37,35	33,62	23,66	18,88	25,10	11,18	100	76,54
2	37,35	33,80	23,66	4,64	25,10	7,11	100	53,17
3	37,35	30,83	23,66	13,05	25,10	10,94	100	68,12
4	37,35	30,55	23,66	0,72	25,10	12,12	100	47,98
5c	37,35	32,28	23,66	7,08	25,10	5,68	100	56,84
6c	37,35	32,02	23,66	7,00	25,10	5,57	100	56,66
7c	37,35	32,20	23,66	7,05	25,10	5,72	100	56,58

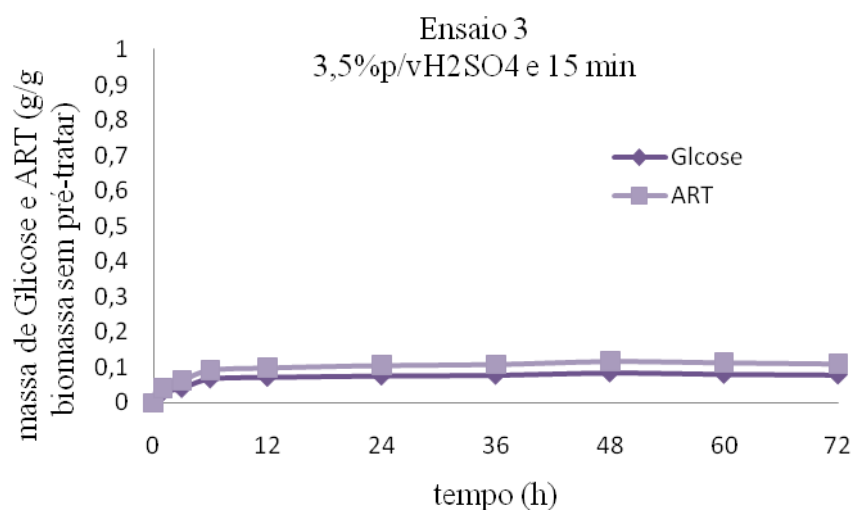


Figura 4.2a. Perfil da hidrólise do ensaio 3.

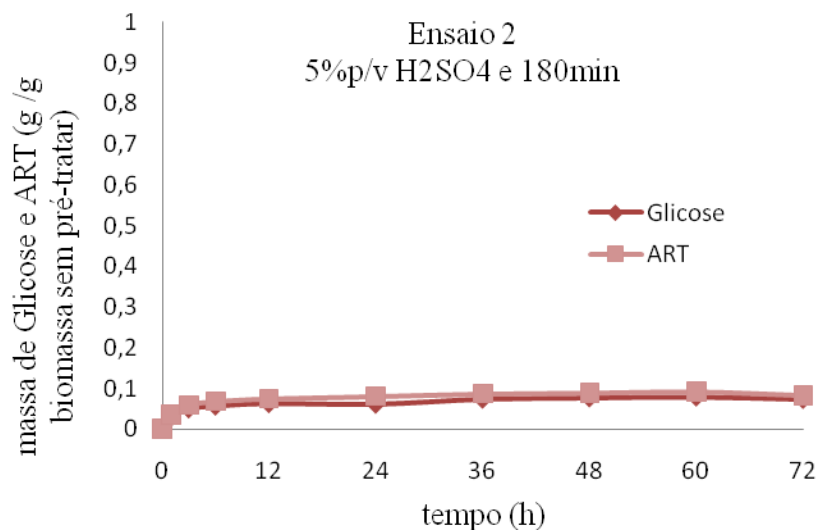


Figura 4.2b. Perfil da hidrólise do ensaio 2

O rendimento da hidrólise enzimática é determinado pela razão de glicose liberada durante a sacarificação relativa ao potencial máximo de glucana presente no bagaço sem pré-tratar. Para um rendimento de glicose de 100%, a maior produção seria de 0,4149 g glicose/g de biomassa sem pré-tratar. Nos dois planejamentos com ácido sulfúrico os rendimentos da glicose foram baixos (figuras 4.2a e 4.2b), o que pode ser parcialmente explicado pela quantidade de lignina presente no bagaço pré-tratado. A presença de lignina é um das dificuldades mais notórias para o ataque enzimático à estrutura da celulose. Um bom pré-tratamento deve contribuir a superar esse problema para atingir bons rendimentos na hidrólise enzimática. No entanto, resultados de outros trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa mostram que é possível obter altos rendimentos mesmo com porcentagens de lignina e xilose relativamente altas no bagaço pré-tratado, o que indica que apenas as quantidades de lignina e hemicelulose removidas não são um indicativo da eficiência do pré-tratamento. Garcia (2009), usando o mesmo bagaço usado neste trabalho, em seus ensaios obteve rendimentos próximos de 100% na hidrólise de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino com percentagem de lignina de 9,87% e de xilana de 16,58%. Fuentes (2009) obteve rendimentos em torno de 80% na hidrólise de bagaço pré-tratado com cal cuja percentagem de lignina era de 15,6% e de hemicelulose de 21,3%, também usando o mesmo bagaço empregado no presente estudo. Estes resultados podem ser vistos na tabela D.1 e indicam que não apenas a remoção destes componentes, mas também a alteração na estrutura do material causada pelo pré-tratamento são importantes para obter altos rendimentos na hidrólise enzimática.

A literatura mostra que o ácido sulfúrico usado como agente no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar solubiliza a xilana e uma pequena parte da lignina, além de redistribuir a estrutura química da lignina remanescente no bagaço (Gia-Luen Go et al, 2009). Como os rendimentos obtidos apenas com pré-tratamentos ácidos foram baixos demais, uma revisão na literatura foi feita e concluiu-se que usando tratamentos ácidos, é necessária uma remoção maior da lignina para se atingir altos rendimentos na hidrólise. Estudos recentes mostraram bons resultados quando hidróxido de sódio foi usado para deslignificar materiais lignocelulósicos (Rocha et al, 2002; Vasquez, et al, 2007).

4.2.2. Teste de deslignificação com hidróxido de sódio

Nesta seção foi feito um estudo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico, usando hidróxido de sódio como agente na remoção da lignina remanescente. Foi agregada mais uma etapa ao processo de pré-tratamento com o fim de melhorar o rendimento na hidrólise enzimática. Essa etapa consistiu em tratar com hidróxido de sódio o bagaço já pré-tratado com ácido sulfúrico, testando condições de temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio (NaOH).

Foi escolhido o ponto central da tabela 4.2a, para testar dois conjuntos de condições, como pode ser visto na tabela 4.5.

Tabela 4.5. Condições da deslignificação com NaOH.

Ensaio	%p/v NaOH	tempo (min)	Temp °C
1	1%	60	100
2	4%	30	120

As duas condições foram tomadas da literatura (Rocha et al, 2002; Vasquez, et al, 2007). O bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico a 2%p/v e um tempo de reação de 97,5 min (ponto central) foi submetido a um processo adicional de deslignificação nas condições da tabela 4.5. Foi analisada a composição depois da deslignificação e a liberação de glicose na hidrólise enzimática feita com 15 FPU/g de bagaço pré-tratado e de β -glicosidase de 7,5 CBU/g de bagaço pré-tratado.

Tabela 4.6. Balanço de massa do bagaço pré-tratado com H₂SO₄ e deslignificado com NaOH e produção de glicose após hidrólise. Massa antes do pré-tratamento: 100g.

Ensaio	g glucana do bagaço pre-tratado com H ₂ SO ₄	g glucana do bagaço pre-tratado com NaOH	g xilana do bagaço pre-tratado com H ₂ SO ₄	g xilana do bagaço pre-tratado com NaOH	g lignina do bagaço pre-tratado com H ₂ SO ₄	g lignina do bagaço pre-tratado com NaOH	Massa após pré-tratamento com H ₂ SO ₄	Massa após pré-tratamento com H ₂ SO ₄ e NaOH	g glicose/g biomassa sem pre-tratar
1	30,58	30,09	11,09	0,00	9,00	2,22	62,79	44,41	0,3218
2	30,58	28,56	11,09	0,00	9,00	0,54	62,79	41,22	0,3178

Na tabela 4.6 pode ser visto que deslignificando o bagaço com 1%p/v de NaOH boa parte da lignina remanescente no bagaço pré-tratado com ácido é retirada, mantendo a quantidade de glucana praticamente inalterada. No ensaio 2 onde o

bagaço é deslignificado com 4%p/v de NaOH e menor tempo, a lignina é retirada praticamente toda, mas a glucana sofre degradação. Pode-se notar na ultima coluna da tabela 4.6 que a produção de glicose após a hidrólise é maior quando o bagaço é pré-tratado com ácido sulfúrico e depois deslignificado nas condições do ensaio 1. Assim, escolhemos trabalhar com deslignificação com 1%p/v NaOH, 60 min de reação e 100°C, para garantir que o componente de interesse, a glucana, vai permanecer inalterado, a lignina vai ser retirada quase totalmente, o rendimento da hidrólise vai atingir valores elevados, além de diminuir os custos como reagente e energia, já que no ensaio 1 usamos menos reagente e temperatura mais baixa.

Uma vez determinadas as condições da deslignificação, pré-tratamentos com ácido sulfúrico e ácido fosfórico foram estudados analisando 3 variáveis de processo: tempo (min), temperatura (°C) e concentração de ácido (%p/v).

4.3. Planejamento 2³ do pré-tratamento com ácido sulfúrico

O estudo da seção 4.2 permitiu ver que os rendimentos de glicose estiveram muito próximos nas duas faixas de concentrações de ácido, sendo que a 3,5%p/v e 5,0%p/v de ácido os rendimentos foram de 20,61% e 18,47% respectivamente. Isto permite concluir que trabalhando com concentrações baixas de ácido se atingem rendimentos semelhantes aos atingidos com altas concentrações.

No planejamento fatorial foram estudadas 3 variáveis de processo: concentração de ácido sulfúrico (%p/v), tempo (min) e temperatura (°C). Os valores decodificados dos níveis de cada uma das variáveis são apresentados na tabela 4.7.

Tabela 4.7. Faixa de valores estudados no planejamento 2³ com ácido sulfúrico

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
H ₂ SO ₄ (%p/v)	0,5	2,5	4,0
Tempo (min)	15	67,5	120
Temperatura	100	120	140

Tabela 4.8. Valores das variáveis em cada um dos ensaios para o pré-tratamento com ácido sulfúrico

Ensaio	Temp °C	tempo min	%p/v H ₂ SO ₄
1	100	15	0,50
2	140	15	0,50
3	100	120	0,50
4	140	120	0,50
5	100	15	4,00
6	140	15	4,00
7	100	120	4,00
8	140	120	4,00
9 (C)	120	68	2,25
10 (C)	120	68	2,25
11 (C)	120	68	2,25

A metodologia experimental pode ser acompanhada nas seções 3.31 e 3.4.1. Após o pré-tratamento ácido, o bagaço foi deslignificado com 1%p/v de NaOH por 60 min a 100°C e a sacarificação foi realizada com uma carga enzimática de 15 FPU/g de bagaço pré-tratado e 7,5 CBU/g de bagaço pré-tratado. As combinações dos níveis em cada um dos ensaios realizados, sendo os ensaios 9, 10 e 11 repetições do ponto central, são mostradas na tabela 4.8.

Em todos os ensaios foram quantificadas as massas de ART e glicose liberadas em função do tempo de hidrólise. As Figuras 4.3 a 4.11 mostram os perfis de hidrólise para cada um dos ensaios. Os dados experimentais relativos a estas figuras são mostrados nas tabelas A.1 e A.2 no apêndice A. A metodologia experimental para a quantificação dos açúcares liberados no meio reacional está descrita na seção 3.3.4.

Figura 4.3. Ensaio 1
(100°C, 15 min, 0,5%w/vH₂SO₄)

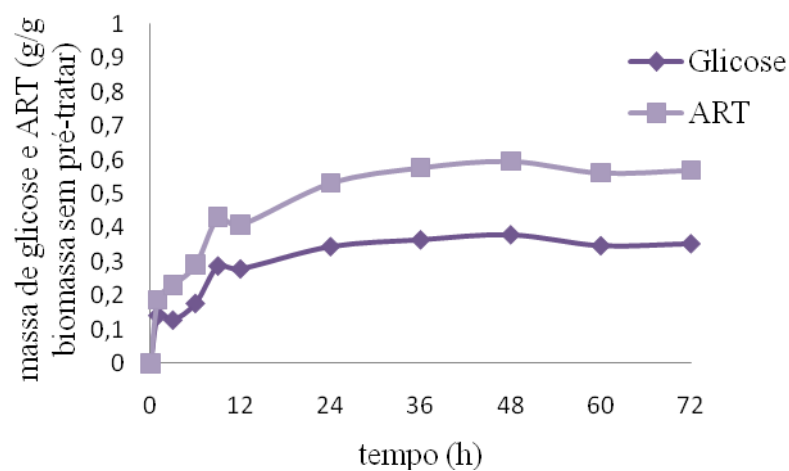


Figura 4.4 Ensaio 2
(140°C, 15 min, 0,5%w/vH₂SO₄)

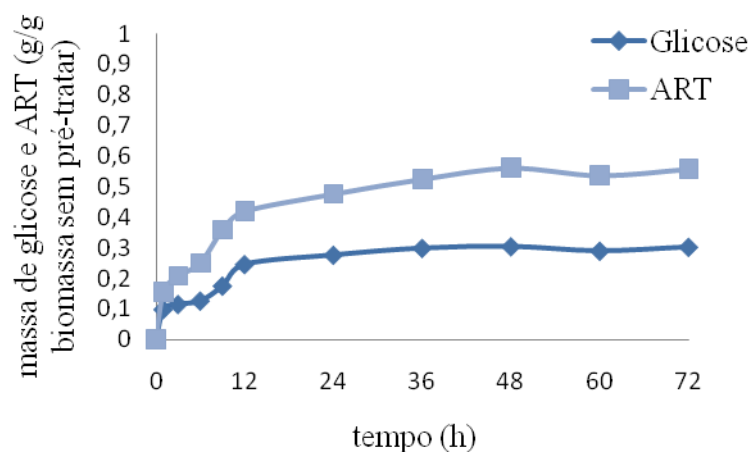


Figura 4.5. Ensaio 3
(100°C, 120 min, 0,5%w/v H₂SO₄)

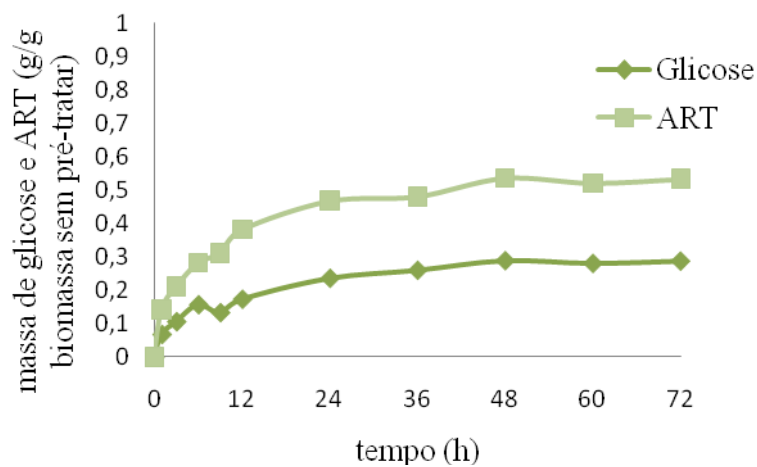


Figura 4.6. Ensaio 4
(140°C, 120 min, 0,5%w/v H₂SO₄)

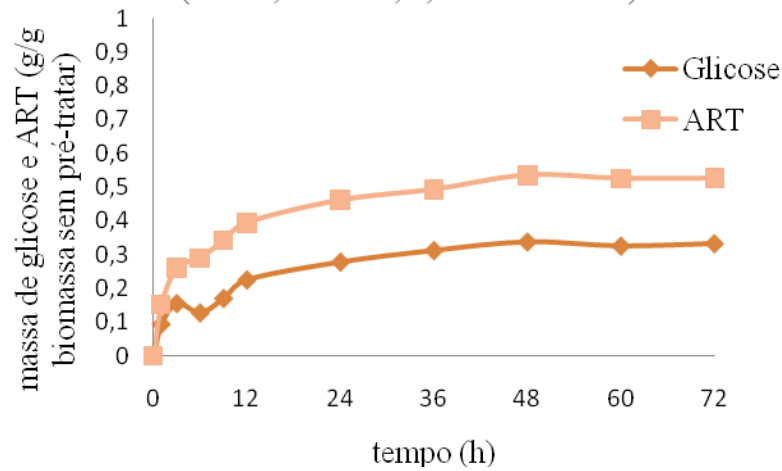


Figura 4.7. Ensaio 5
(100°C, 15 min, 4%w/v H₂SO₄)

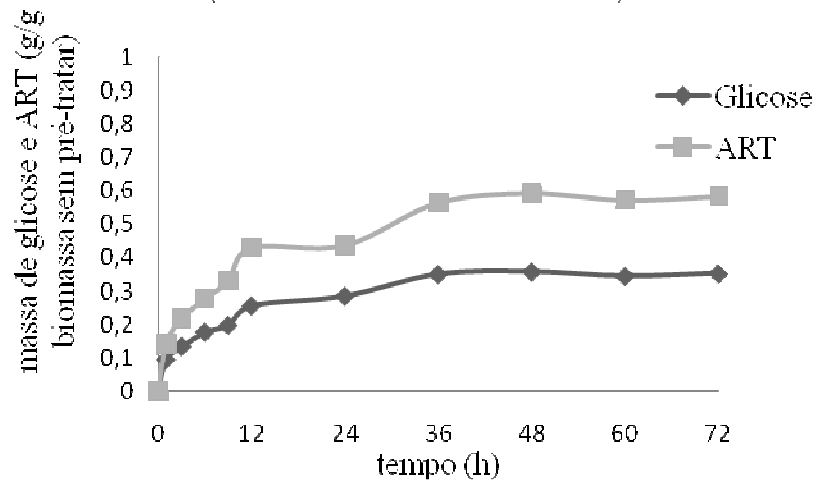


Figura 4.8. Ensaio 6
(140°C, 15 min, 4%w/v H₂SO₄)

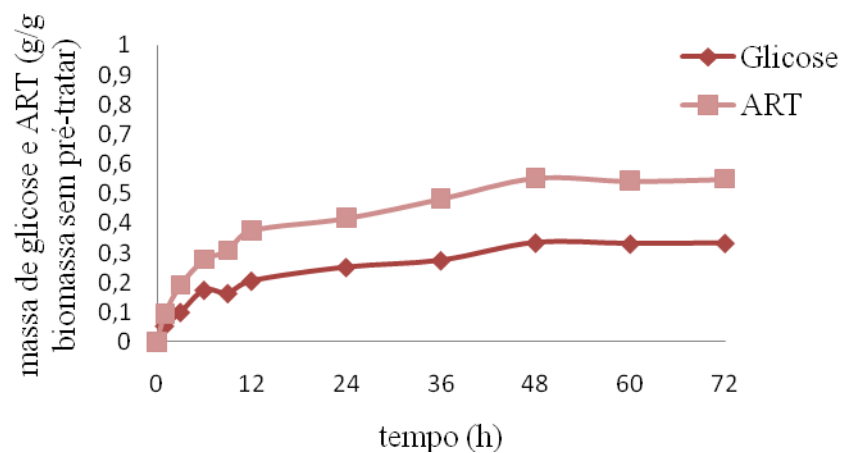


Figura 4.9. Ensaio 7
(100°C, 120 min, 4%w/v H₂SO₄)

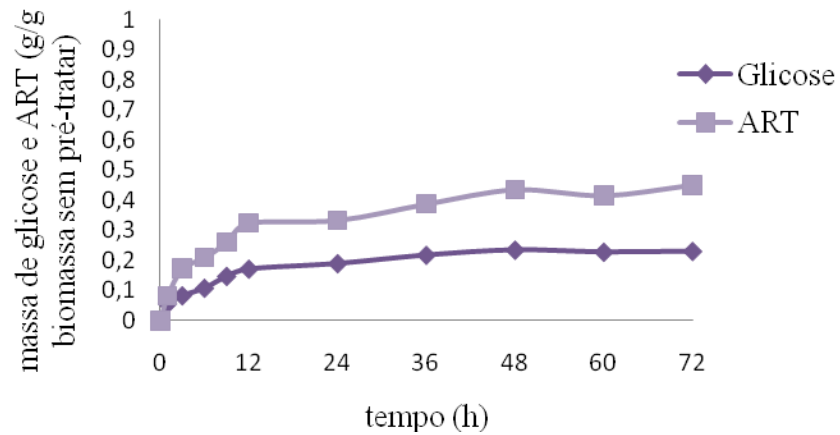


Figura 4.10. Ensaio 8
(140°C, 120 min, 4%w/v H₂SO₄)

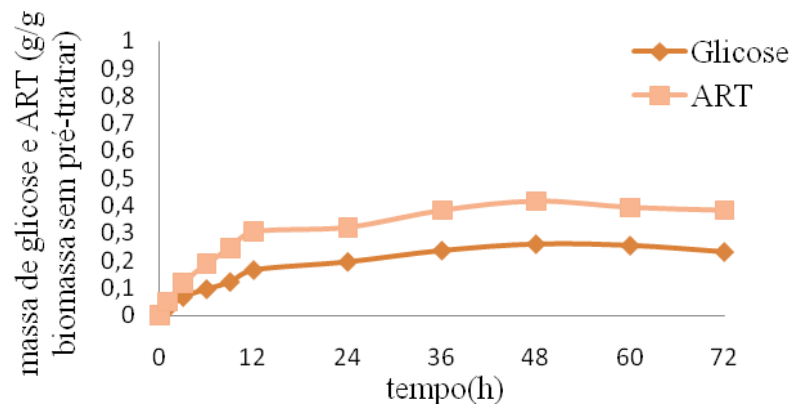
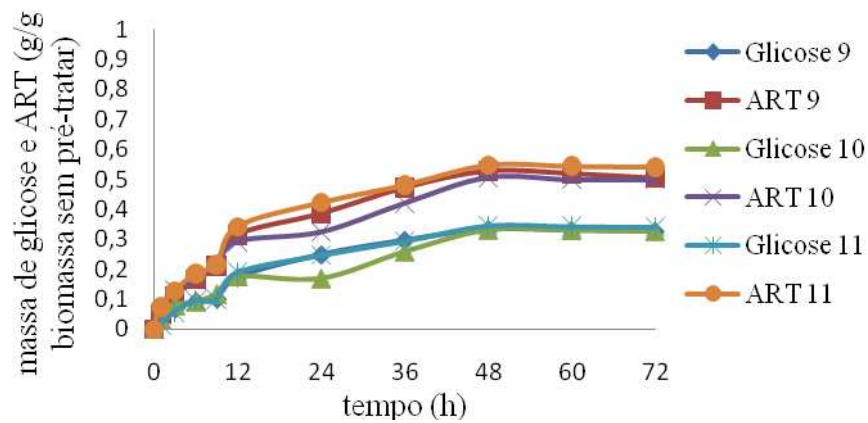


Figura 4.11. Ensaios 9,10 e 11
(120°C, 68 min, 2,25%w/v H₂SO₄)



É apresentada na tabela 4.9 a matriz de planejamento com as combinações dos níveis para cada um dos ensaios e sua respectiva resposta de concentração de glicose e ART. Os ensaios 9, 10 e 11, representam repetições no ponto central. As concentrações de ART e glicose são expressas como g/g biomassa sem pré-tratar.

Tabela 4.9. Matriz de planejamento com os resultados da massa de glicose e ART liberados na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e deslignificado com NaOH.

Ensaio	Temp °C	tempo min	%p/v H ₂ SO ₄	g glicose/g biomassa sem pré-tratar	g ART/g biomassa sem pré-tratar
1	100	15	0,50	0,3806	0,5960
2	140	15	0,50	0,3035	0,5616
3	100	120	0,50	0,2872	0,5354
4	140	120	0,50	0,3381	0,5349
5	100	15	4,00	0,3563	0,5925
6	140	15	4,00	0,3340	0,5529
7	100	120	4,00	0,2359	0,4348
8	140	120	4,00	0,2584	0,4157
9 (C)	120	68	2,25	0,3323	0,5272
10 (C)	120	68	2,25	0,3301	0,5069
11 (C)	120	68	2,25	0,3457	0,5472

Na tabela 4.9 pode se notar que a maior produção de glicose e ART ocorreram no ensaio 1, com menor tempo, baixa concentração de ácido e baixa temperatura (no nível -1 para todos os fatores 100°C, 15 min e 0,5%p/v H₂SO₄) apresentando um valor de 0,3806 g glicose/g bagaço sem pré-tratar, que corresponde a um rendimento de 91,73%.

4.3.1. Determinação dos efeitos principais e de interação das variáveis

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada utilizando o erro puro e o software Statística (Statsoft, v. 7.0). Com o fim de avaliar a etapa do pré-tratamento com ácido sulfúrico, foi tomada como variável de resposta a produção de glicose após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado.

Tabela 4.10. Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2^3 com ácido sulfúrico

	Efeito	Desvio padrão	Intervalo de confiança -90%	Intervalo de confiança +90%	Coefficiente do modelo
Média	0,318370	0,002546	0,310936	0,325804	0,318370
(1) Temp °C	-0,006511	0,005970	-0,023945	0,010922	-0,003256
(2) tempo min	-0,063708	0,005970	-0,081142	-0,046274	-0,031854
(3) %p/v H ₂ SO ₄	-0,031204	0,005970	-0,048637	-0,013770	-0,015602
1 by 2	0,043186	0,005970	0,025752	0,060620	0,021593
1 by 3	0,006643	0,005970	-0,010791	0,024076	0,003321
2 by 3	-0,034319	0,005970	-0,051753	-0,016885	-0,017160
1*2*3	-0,020816	0,005970	-0,038249	-0,003382	-0,010408

A análise dos efeitos principais e das interações na massa liberada de glicose pode ser vista na Tabela 4.10. A Figura 4.12 mostra o gráfico de Pareto considerando 90% de confiança. Este nível de confiança foi determinado em trabalhos anteriores como adequado (Rabelo, 2007).

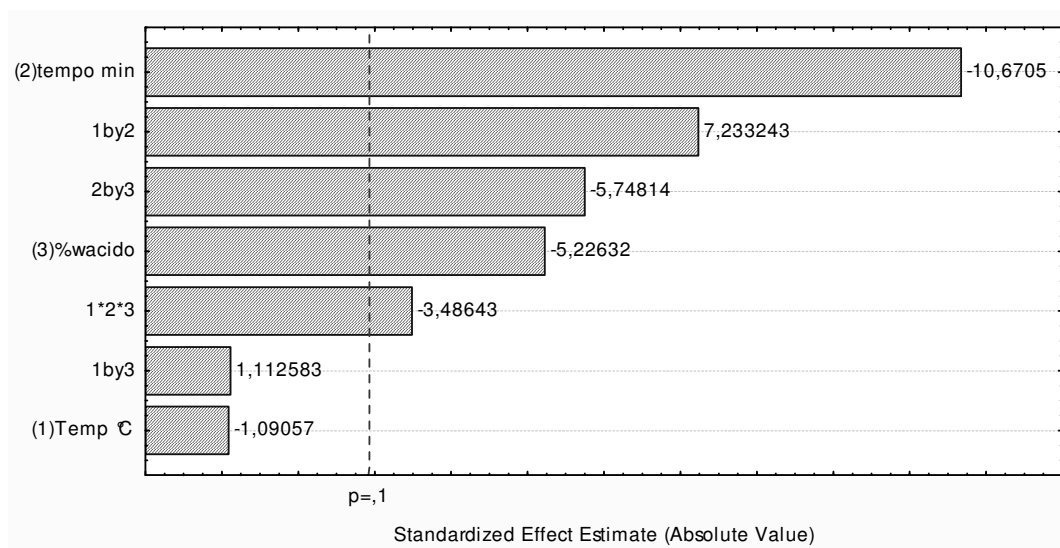


Figura 4.12. Gráfico de Pareto para a massa de glicose liberada para planejamento 2^3 com ácido sulfúrico

Na Figura 4.12 nota-se que a variável temperatura, e a interação temperatura/concentração de H_2SO_4 (1*3), não se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança. Logo, o efeito temperatura e a interação 1*3 foram eliminados do modelo. Nota-se analisando a Tabela 4.10 que os efeitos principais de tempo, temperatura e concentração de ácido sulfúrico são negativos, o que, desconsiderando as interações, sugere que os melhores resultados deveriam ser obtidos quando os fatores forem mantidos nos valores mínimos (ensaio 1).

A equação 5 mostra o modelo que foi obtido com os valores dos coeficientes estatisticamente significativos tomados da tabela 4.10. Com o fim de validar este modelo é necessário realizar o teste F, para que o modelo possa ser usado para fins preditivos. Na equação $X1$ é a temperatura, $X2$ o tempo e $X3$ a concentração de ácido sulfúrico, todos codificados.

$$\frac{g \text{ glicose}}{g \text{ bagaço sem pré-tratar}} = 0,318370 - 0,031854X_2 - 0,015602X_3 + 0,021593X_1X_2 - 0,017160X_2X_3 - 0,010408X_1X_2X_3$$

(5)

4.3.2. Análise estatística da massa de glicose liberada na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.

Para um modelo ser considerado estatisticamente significativo, o valor de F da regressão deve ser maior do que o tabelado e o teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo deve apresentar um valor muito menor que o valor tabelado. O F da regressão é calculado dividindo a media quadrática da regressão entre a media quadrática dos resíduos e o F da falta de ajuste é calculado dividindo a media quadrática da falta de ajuste entre a media quadrática do erro puro. Se essas duas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado significativo (Barros Neto, et al 2003). Para determinar se o modelo da equação 5 é estatisticamente significativo, é apresentada a análise de variância (ANOVA) na tabela 4.11.

Tabela 4.11. Análise da variância do modelo para o planejamento 2^3 com ácido sulfúrico

F variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Teste F
Regressão R	0,017017	5	0,0034034	10,62
Resíduos r	0,001603	5	0,0003205	
Falta de ajuste faj	0,001460	3	0,0004867	6,83
Erro puro	0,000143	2		
Total	0,018620	10		

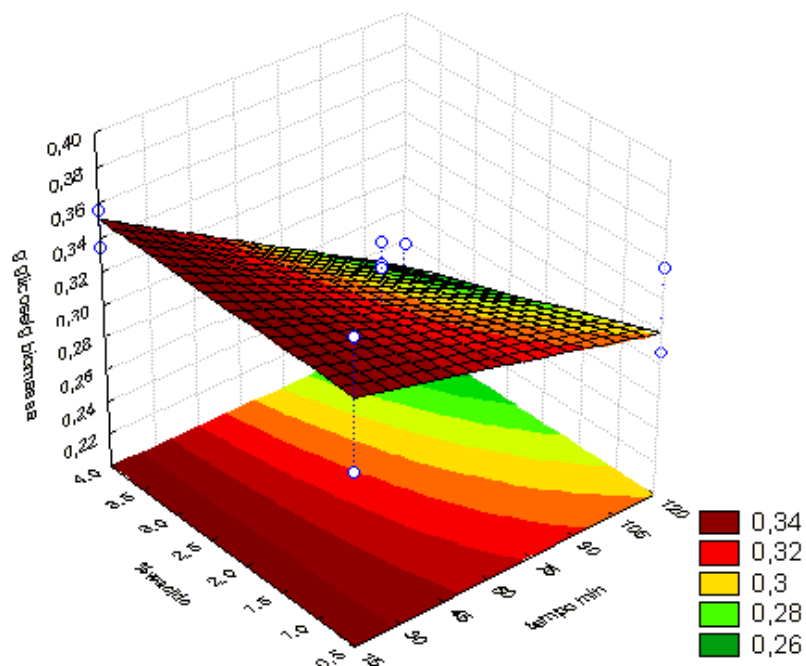
*F(tab.) $_{5,5} = 3,45$ no nível de 90% para a regressão

*F(tab.) $_{3,2} = 9,16$ no nível de 90% para a falta de ajuste

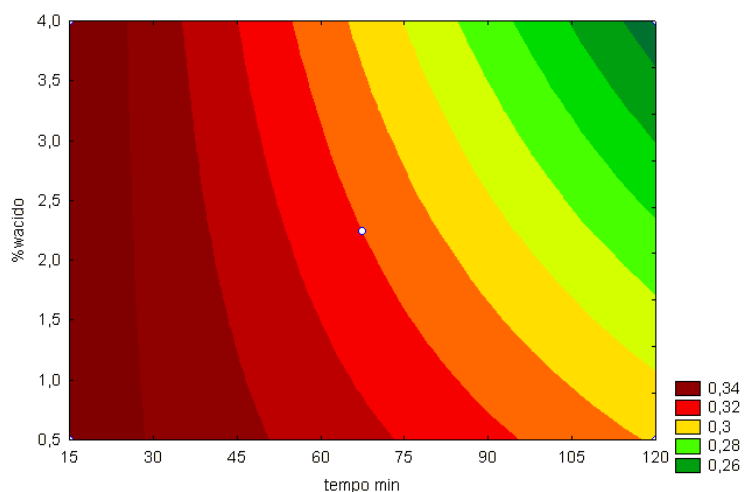
*Valores retirados da Tabela A.4, Barros Neto et al (2003).

Analisando a tabela 4.11, podemos perceber que o valor do teste $F_{\text{regressão}}$ calculado para o modelo foi de 10,62, sendo maior que o valor tabelado ($F_{5,5} = 3,45$), cumprindo com a regra do teste. O F_{faj} calculado apresentou um valor de 6,83, o qual foi menor que o valor tabelado ($F_{3,2} = 9,16$), cumprindo a condição do teste F para a falta de ajuste, o que quer dizer que o modelo linear descreve satisfatoriamente a superfície de resposta. Com estes resultados a equação do modelo pode ser considerada significativa com 90% de confiança, podendo ser usada para fins preditivos.

As figuras 4.13 e 4.14 mostram a superfície de resposta e a curva de nível quando a temperatura é mantida no valor mínimo e máximo.



(a)

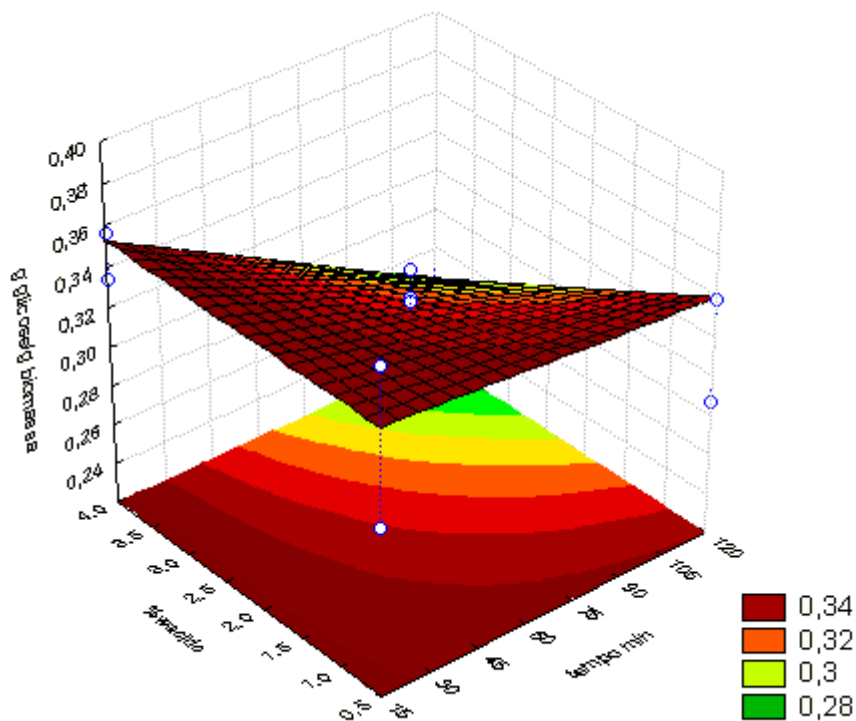


(b)

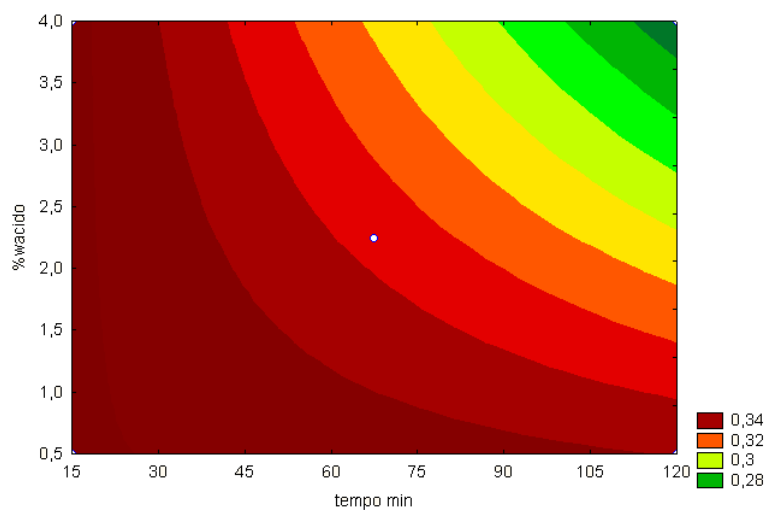
Figura 4.13. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação 5. Temperatura 100°C

Ao analisar a figura 4.13 observa-se que quando a temperatura é mantida no nível inferior a influência do tempo é grande, mas obtêm-se altos rendimentos para uma ampla faixa de concentração do ácido sulfúrico se o tempo é mantido no nível mais baixo. Um efeito parecido mostra a figura 4.14, apesar de a temperatura estar no nível superior (140°C) altos rendimento são conseguidos para uma ampla faixa de concentrações mantendo o tempo no nível inferior (15 min). Estes gráficos

confirmam que a temperatura não tem influência no rendimento da hidrólise enzimática, sendo possível trabalhar com a menor temperatura. O máximo de glicose foi conseguido a baixas concentrações e menores tempos, mantendo a temperatura em 100°C.



(a)



(b)

Figura 4.14. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação
5. Temperatura 140°C

4.4. Planejamento 2³ do pré-tratamento com ácido fosfórico

Continuando os estudos do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácidos diluídos, nesta seção será analisado o pré-tratamento com ácido fosfórico diluído, trabalhando nas mesmas faixas do planejamento 2³ com ácido sulfúrico para efeito de comparação.

Iniciou-se um planejamento fatorial onde foram estudadas 3 variáveis de processo: concentração de ácido fosfórico (%p/v), tempo (min) e temperatura (°C).

Os valores decodificados dos níveis de cada uma das variáveis são apresentados na tabela 4.12.

Tabela 4.12. Faixa de valores estudados no planejamento 2³ com ácido fosfórico

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
H ₃ PO ₄ (%p/v)	0,5	2,5	4,0
Tempo (min)	15	67,5	120
Temperatura	100	120	140

A metodologia experimental pode ser acompanhada nas seções 3.31 e 3.4.1. Após o pré-tratamento, o bagaço foi deslignificado com 1% p/v de NaOH por 60 min a 100°C e a sacarificação foi realizada com uma carga enzimática de 15 FPU/g de bagaço pré-tratado e 7,5 CBU/g de bagaço pré-tratado. As combinações dos níveis em cada um dos ensaios realizados, sendo os ensaios 9, 10 e 11 repetições do ponto central, são mostradas na tabela 4.13.

Em todos os ensaios foram quantificadas as massas de ART e glicose liberadas em função do tempo de hidrólise. As Figuras 4.15 a 4.23 mostram os perfis de hidrólise para cada um dos ensaios com bagaço pré-tratado com ácido fosfórico deslignificado com soda. Os dados experimentais relativos a estas figuras são mostrados nas tabelas B.1 e B.2 no apêndice B. A metodologia experimental para a quantificação dos açúcares liberados no meio reacional está descrita na seção 3.3.4.

Tabela 4.13. Valores das variáveis em cada um dos ensaios para o pré-tratamento com ácido fosfórico

Ensaio	Temp °C	tempo min	%p/v H ₃ PO ₄
1	100	15	0,50
2	140	15	0,50
3	100	120	0,50
4	140	120	0,50
5	100	15	4,00
6	140	15	4,00
7	100	120	4,00
8	140	120	4,00
9 (C)	120	68	2,25
10 (C)	120	68	2,25
11 (C)	120	68	2,25

Figura 4.15. Ensaio 1
(100°C, 15 min, 0,5%w/v H₃PO₄)

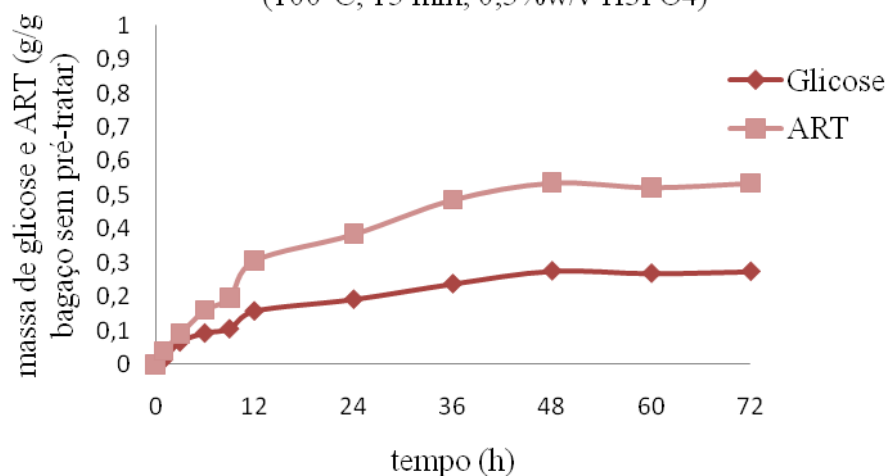
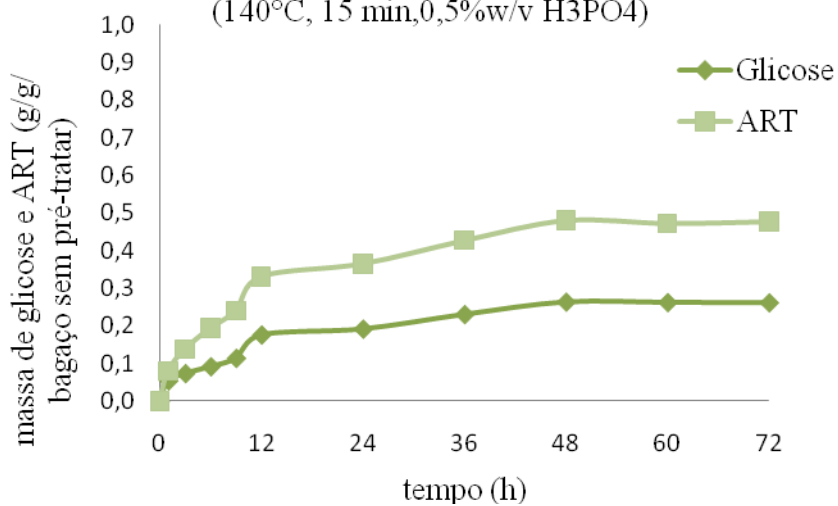


Figura 4.16. Ensaio 2
(140°C, 15 min, 0,5%w/v H₃PO₄)



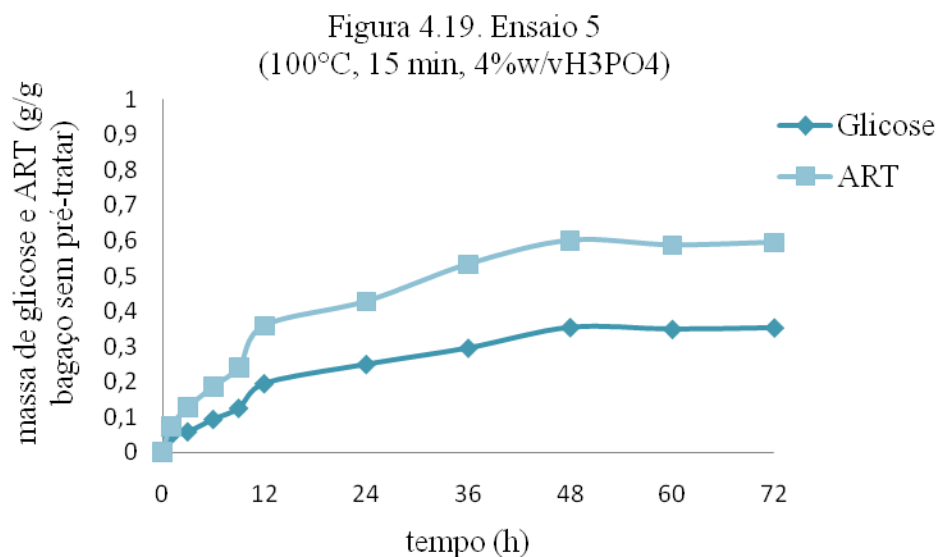
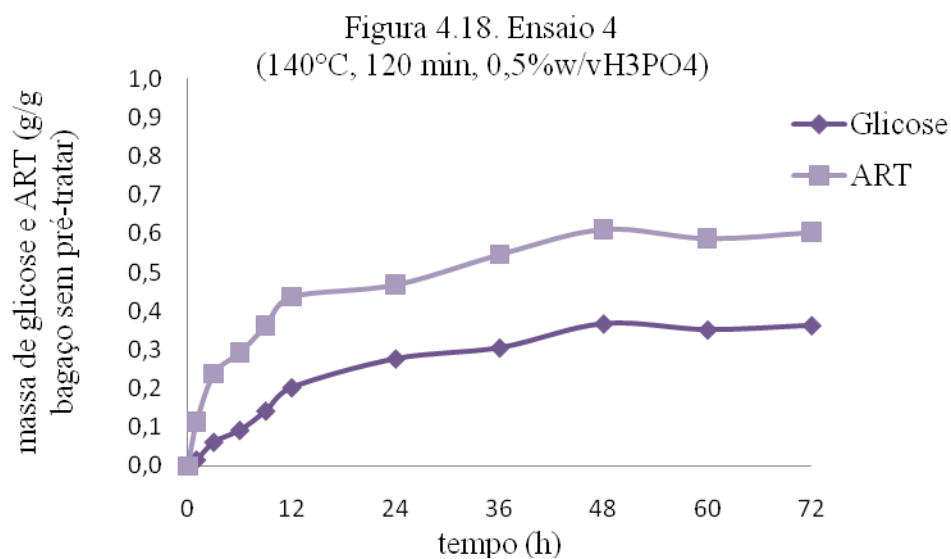
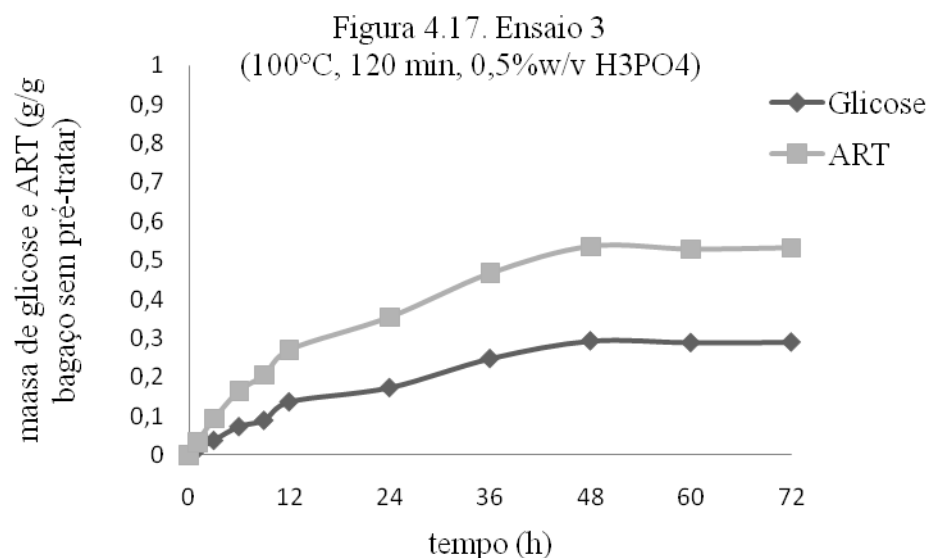


Figura 4.20. Ensaio 6
(140°C, 15min, 4%w/v H₃PO₄)

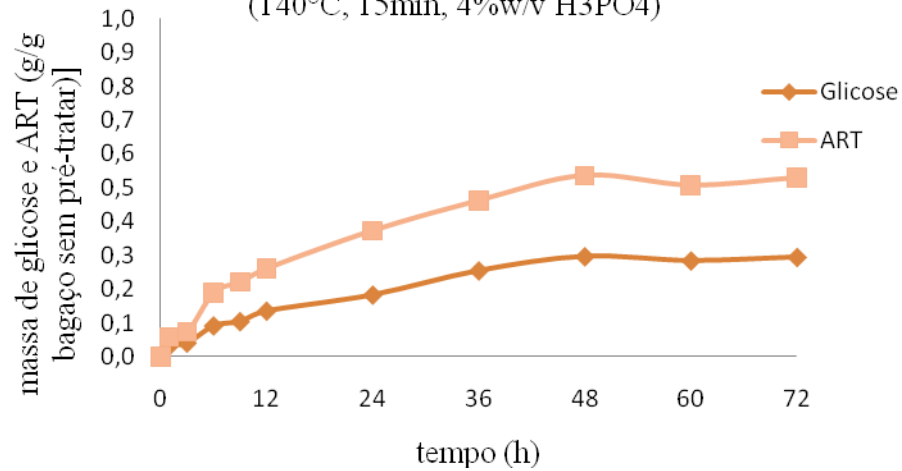


Figura 4.21. Ensaio 7
(100°C, 120 min, 4%w/v H₃PO₄)

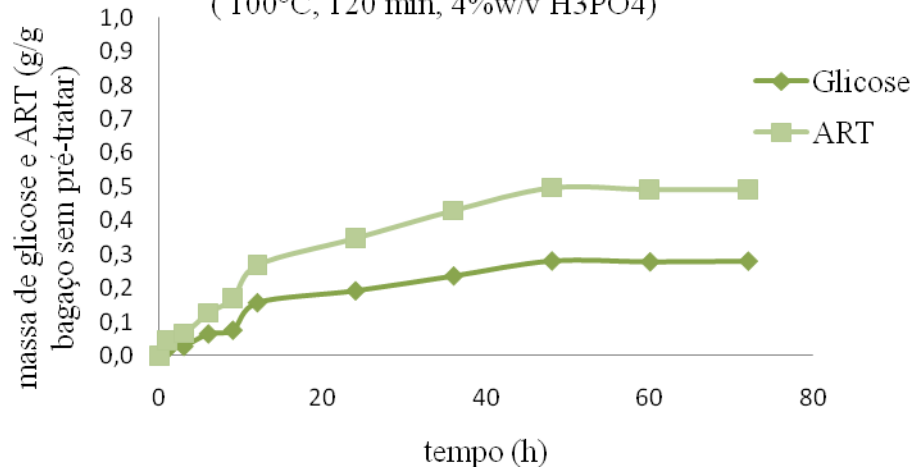
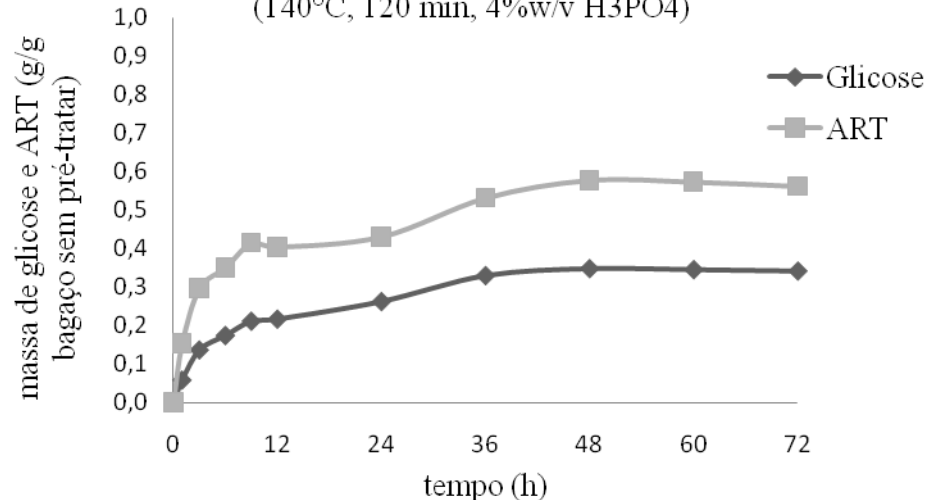
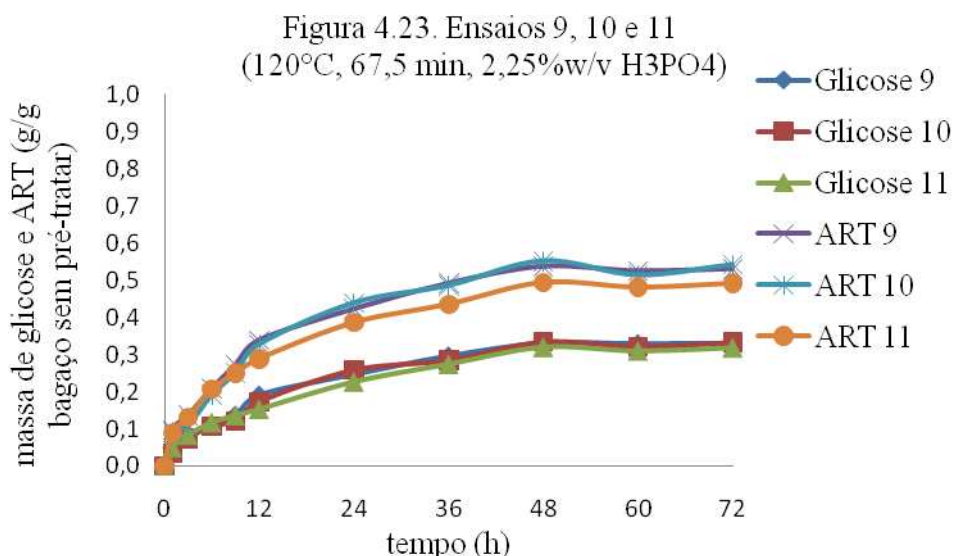


Figura 4.22. Ensaio 8
(140°C, 120 min, 4%w/v H₃PO₄)





É apresentada na tabela 4.14 a matriz de planejamento com as combinações dos níveis para cada um dos ensaios e sua respectiva resposta de concentração de glicose e ART após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado e deslignificado. Os ensaios 9, 10 e 11, representam repetições no ponto central. As concentrações de ART e glicose são expressas como g/g biomassa sem pré-tratar.

Tabela 4.14. Matriz de planejamento com os resultados da massa de glicose e ART liberados na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico.

Ensaio	Temp °C	tempo min	%p/v H ₃ PO ₄	g glicose/g biomassa sem pré- tratar	g ART/g biomassa sem pré- tratar
1	100	15	0,50	0,2758	0,5360
2	140	15	0,50	0,2644	0,4804
3	100	120	0,50	0,2943	0,5356
4	140	120	0,50	0,3670	0,6118
5	100	15	4,00	0,3530	0,5998
6	140	15	4,00	0,2966	0,5353
7	100	120	4,00	0,2806	0,4965
8	140	120	4,00	0,3491	0,5780
9 (C)	120	68	2,25	0,3301	0,5365
10 (C)	120	68	2,25	0,3338	0,5510
11 (C)	120	68	2,25	0,3207	0,4938

Na tabela 4.14 pode se notar que a maior produção de glicose e ART ocorreram no ensaio 4, no maior tempo e temperatura e a baixas concentrações de ácido (140°C, 120 min e 0,5%p/v H₃PO₄) apresentando um valor de 0,3670 g glicose/g bagaço sem pré-tratar e 0,6118 g ART/g bagaço sem pré-tratar, que corresponde a 88,44%.

4.4.1. Determinação dos efeitos principais e de interação das variáveis

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada utilizando o erro puro e o software Statistica (Statsoft, v. 7.0). Com o fim de avaliar a etapa do pré-tratamento com ácido fosfórico, foi tomada como variável de resposta a produção de glicose após a hidrólise do bagaço pré-tratado e deslignificado. A análise dos efeitos principais e das interações na massa liberada de glicose pode ser vista na Tabela 4.15. A Figura 4.24 mostra o gráfico de Pareto considerando 90% de confiança.

Tabela 4.15. Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento 2³ com ácido fosfórico

	Efeito	Desvio padrão	Intervalo de confiança -90%	Intervalo de confiança +90%	Coeficiente do modelo
Média	0,315036	0,002036	0,309091	0,320982	0,315036
(1) Temp °C	0,018350	0,004775	0,004406	0,032294	0,009175
(2) tempo min	0,025300	0,004775	0,011356	0,039244	0,012650
(3) %p/v H ₃ PO ₄	0,019450	0,004775	0,005506	0,033394	0,009725
1 by 2	0,052250	0,004775	0,038306	0,066194	0,026125
1 by 3	-0,012300	0,004775	-0,026244	0,001644	-0,006150
2 by 3	-0,035250	0,004775	-0,049194	-0,021306	-0,017625
1*2*3	0,010200	0,004775	-0,003744	0,024144	0,005100

Na Figura 4.24 nota-se que as interações das variáveis temperatura e ácido (1*3), e temperatura/concentração de H₃PO₄/tempo (1*2*3), não se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança. Nota-se analisando a Tabela 4.15 que os efeitos principais de tempo, temperatura e concentração de ácido sulfúrico são positivos, o que, desconsiderando as interações, sugere que os melhores resultados deveriam ser obtidos quando os fatores forem mantidos nos valores máximos.

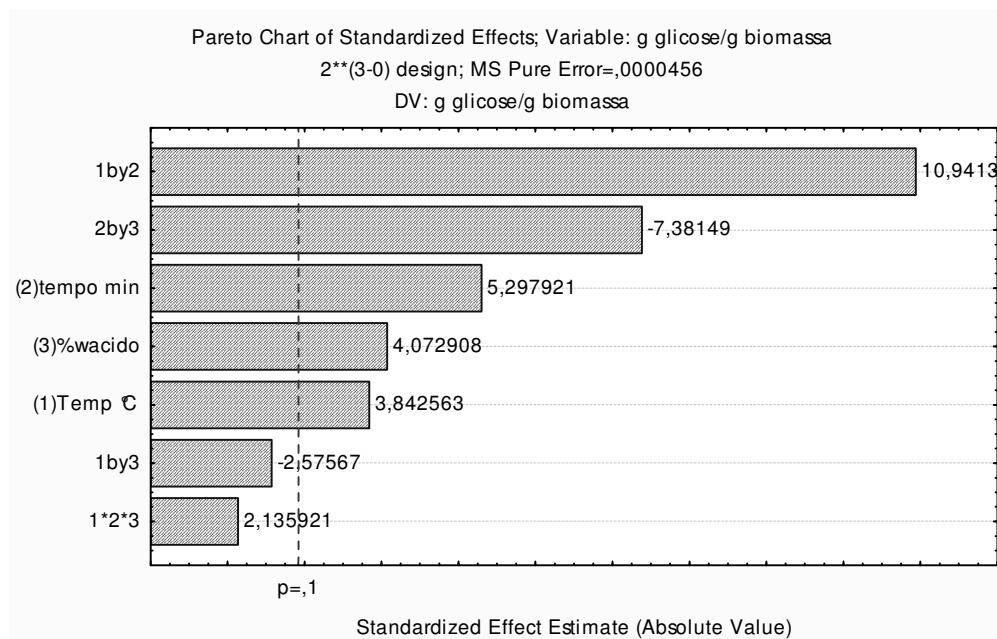


Figura 4.24. Gráfico de Pareto para a massa de glicose liberada para planejamento 2^3 com ácido fosfórico

A equação 6 mostra o modelo que foi obtido com os valores dos coeficientes significativos tomados da tabela 4.15. Com o fim de validar este modelo é necessário realizar o teste F, para que o modelo possa ser usado para fins preditivos. Na equação $X1$ é a temperatura, $X2$ o tempo e $X3$ a concentração de ácido fosfórico, todos codificados.

$$\frac{g \text{ glicose}}{g \text{ bagaça sem pré-tratar}} = 0,315036 + 0,009175X1 + 0,012650X2 + 0,009725X3 + 0,026125X1X2 - 0,017625X2X3$$

(6)

4.4.2. Análise estatística da massa de glicose liberada na hidrólise do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico

Para um modelo ser considerado estatisticamente significativo, o valor de F da regressão deve ser maior do que o tabelado e o teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo devem apresentar um valor muito menor que o valor tabelado, como foi descrito no item 4.3.2. Para determinar se o modelo da equação 6 é estatisticamente significativo, é apresentada a análise de variância na tabela 4.16.

Tabela 4.16. Análise de variância (ANOVA) do modelo para o planejamento 2^3 com ácido fosfórico

F variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Teste F
Regressão R	0,010655	5	0,0021311	8,09
Resíduos r	0,001317	5	0,0002633	
Falta de ajuste faj	0,001225	3	0,0004085	8,96
Erro puro	0,000091	2		
Total	0,011972	10		

*F(tab.) $_{5,5} = 3,45$ no nível de 90% para a regressão

*F(tab.) $_{3,2} = 9,16$ no nível de 90% para a falta de ajuste

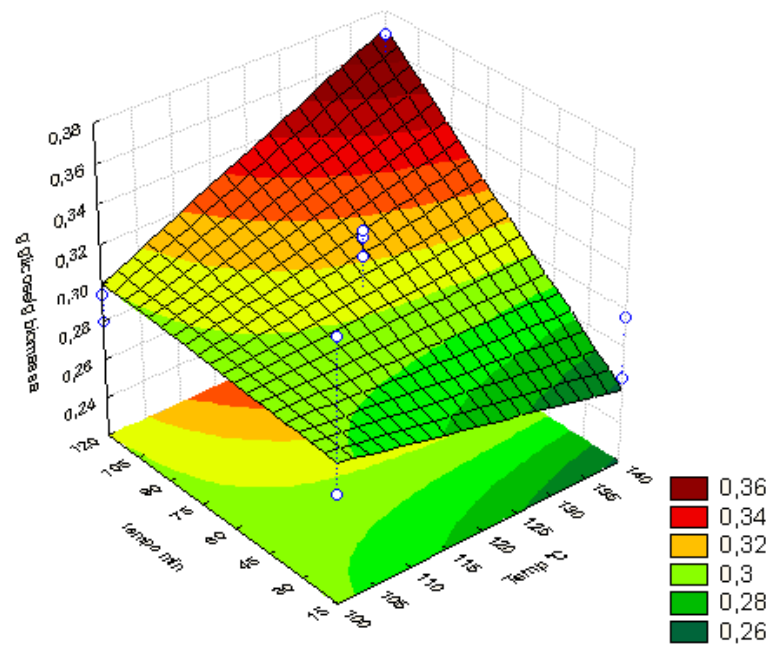
*Valores retirados da Tabela A.4, Barros Neto et al (2003).

Analisando a tabela 4.16, podemos perceber que o valor do teste $F_{\text{regressão}}$ calculado para o modelo foi de 8,09, sendo maior que o valor tabelado ($F_{5,5} = 3,45$), cumprindo com a regra do teste. O F_{faj} calculado foi alto, apresentando um valor de 8,96, ligeiramente menor que o valor tabelado ($F_{3,2} = 9,16$). Embora o modelo quase não tenha passado neste teste, ainda pode ser usado para traçar a superfície de resposta, embora as conclusões tiradas com ele devam ser analisadas cuidadosamente. Com estes resultados a equação do modelo pode ser considerada significativa com 90% de confiança, podendo ser usada para fins preditivos.

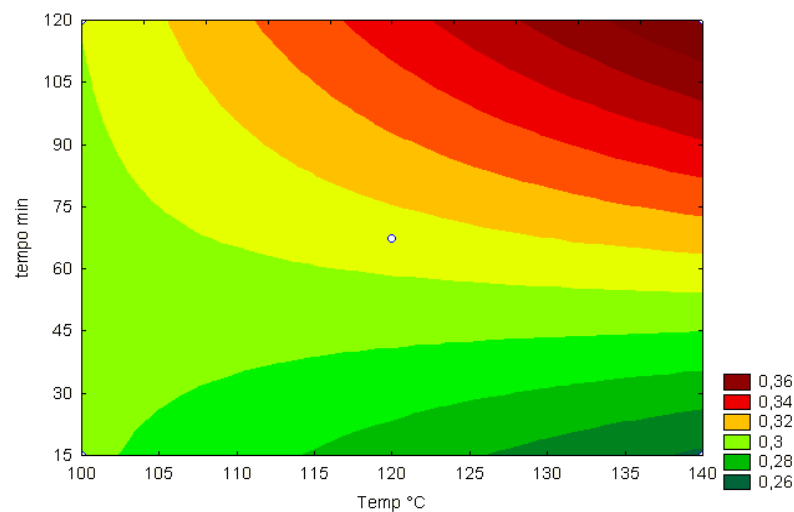
As figuras 4.25 e 4.26 mostram a superfície de resposta e a curva de nível quando a concentração de ácido é mantida no valor mínimo e máximo.

Ao analisar a figuras 4.25 observa-se que quando a concentração de ácido é mantida no nível inferior a influência do tempo e da temperatura é grande, atingindo-se altos rendimentos apenas nos níveis superiores destas variáveis. Na figura 4.26, com a concentração de ácido fosfórico no nível superior (4%p/v) altos rendimento são conseguidos tanto para altos tempos e temperaturas quanto para valores baixos destas variáveis. O máximo de glicose foi conseguido com tempos e temperaturas maiores, mantendo a concentração em 0,5%p/v de ácido fosfórico, além de resultar num aumento nos açúcares totais. Um valor próximo em rendimento da glicose pode

ser conseguido a tempo e temperatura baixos mas mantendo a concentração de ácido em 4%p/v, resultando numa concentração menor de açúcares totais.

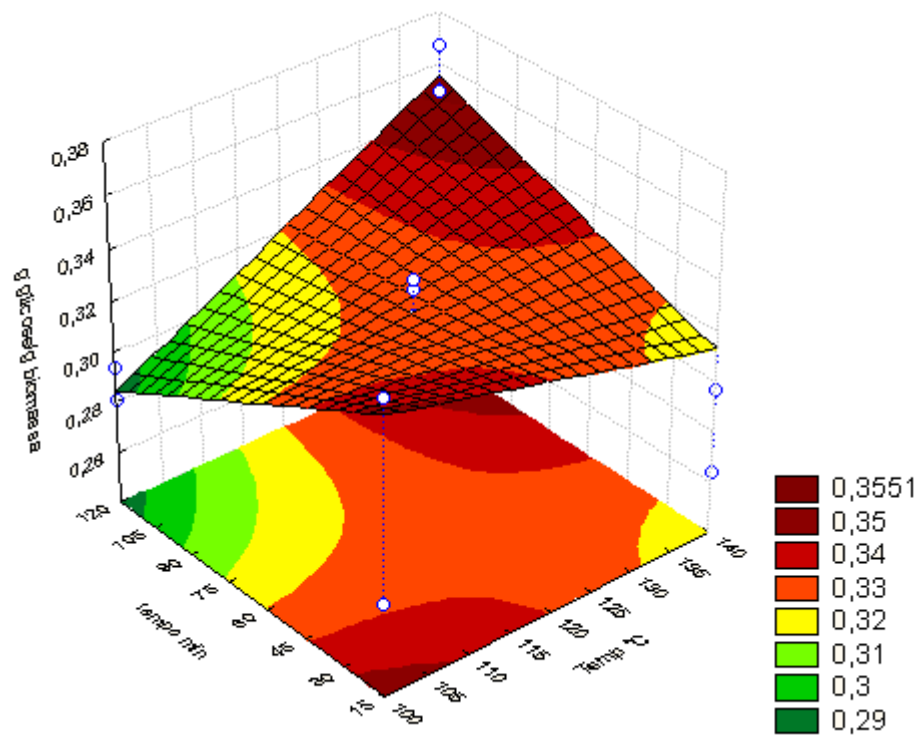


(a)

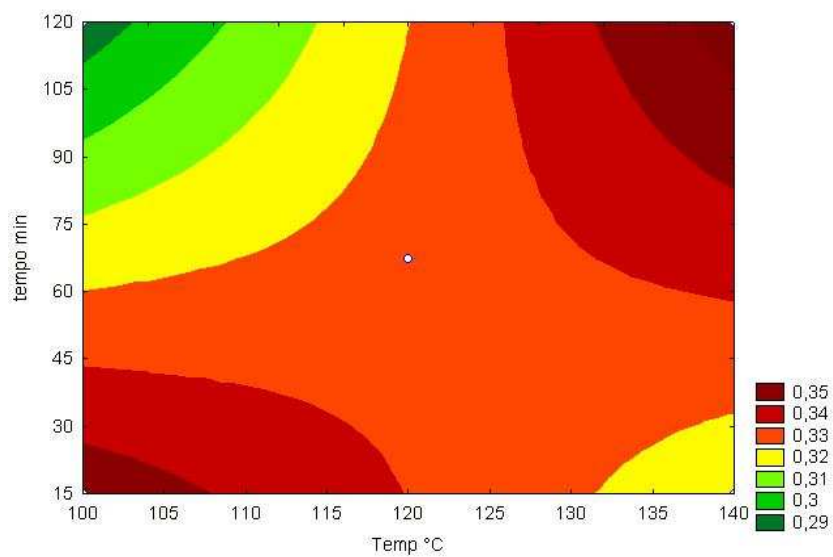


(b)

Figuras 4.25. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação 6. Concentração de ácido 0,5%p/v



(a)



(b)

Figuras 4.26. Superfície de Resposta (a) e curva de nível (b) descrita pela equação 6. Concentração de ácido 4%p/v

4.5. Seleção da melhor condição de cada pré-tratamento

Nos resultados obtidos em cada planejamento fatorial 2^3 vimos que vários ensaios apresentaram altos rendimentos na hidrólise enzimática.

A tabela 4.17 mostra os rendimentos de cada um dos ensaios do planejamento 2^3 com ácido sulfúrico, calculados através da equação 4. O ensaio 1 apresentou o maior rendimento (91,73%) nas condições de 100°C, 15 minutos de reação e 0,5%p/v de H_2SO_4 e deslignificado com 1%p/v NaOH por 1h a 100°C, sendo o ensaio escolhido como melhor ponto deste planejamento.

Tabela 4.17. Rendimentos na hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e deslignificado com hidróxido de sódio

Ensaio	Temp °C	tempo min	%p/v H_2SO_4	g glicose/g biomassa	% Rendimento glicose
1	100	15	0,50	0,3806	91,73
2	140	15	0,50	0,3035	73,13
3	100	120	0,50	0,2872	69,22
4	140	120	0,50	0,3381	81,47
5	100	15	4,00	0,3563	85,86
6	140	15	4,00	0,3340	80,50
7	100	120	4,00	0,2359	56,85
8	140	120	4,00	0,2584	62,27
9 (C)	120	68	2,25	0,3323	80,08
10 (C)	120	68	2,25	0,3301	79,55
11 (C)	120	68	2,25	0,3457	83,31

Para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico o maior rendimento foi de aproximadamente 88,44% nas condições de 140°C, 120 minutos de reação e 0,5%p/v H_3PO_4 (ensaio 4) quando o bagaço pré-tratado foi deslignificado com 1%p/v NaOH por 1h a 100°C. Paralelamente, como já foi exposto na análise estatística rendimentos próximos (85,07%) podem ser atingidos a condições de 100°C, 15 minutos de reação e 4%p/v H_3PO_4 (ensaio 5) quando o bagaço pré-tratado foi deslignificado com 1%p/v NaOH por 1h a 100°C. Embora o ensaio 5 apresente menor tempo e temperatura, o ensaio 1 é escolhido como melhor ponto, já que se gastaria menos reagente obtendo

maiores rendimentos de glicose e açúcares totais. Estes resultados são apresentados na tabela 4.18. Os rendimentos foram calculados a partir da equação 4.

Tabela 4.18. Rendimentos na hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio

Ensaio	Temp °C	tempo min	%p/v H ₃ PO ₄	g glicose/g biomassa	% Rendimento glicose
1	100	15	0,50	0,2758	66,46
2	140	15	0,50	0,2644	63,72
3	100	120	0,50	0,2943	70,91
4	140	120	0,50	0,3670	88,44
5	100	15	4,00	0,3530	85,07
6	140	15	4,00	0,2966	71,47
7	100	120	4,00	0,2806	67,63
8	140	120	4,00	0,3491	84,13
9 (C)	120	68	2,25	0,3301	79,55
10 (C)	120	68	2,25	0,3338	80,44
11 (C)	120	68	2,25	0,3207	77,29

4.6. Seleção do pré-tratamento a ser usado nas etapas posteriores

A utilização de soluções diluídas de ácido fosfórico tem mostrado resultados promissores para o tratamento de biomassa. O uso de soluções diluídas de ácido fosfórico como catalisador, comparativamente aos procedimentos que utilizam ácidos mais fortes como o ácido sulfúrico, apresentam menor efeito destrutivo sobre as pentoses, com menor acúmulo de furfural no meio de reação (Gámez et al., 2006).

Os substratos produzidos a partir dos pré-tratamentos que utilizam ácido sulfúrico também necessitam de alguma forma de neutralização após o pré-tratamento. Isto adiciona novos passos ao processo, com implicações inevitáveis nos custos operacionais. Além disso, este ácido promove a corrosão interna dos equipamentos, exigindo a construção de reatores mais resistentes e, portanto, mais caros. Contrariamente, o ácido fosfórico, adicionado ao pré-tratamento na forma de soluções diluídas, além de não necessitar destes cuidados, pode constituir fonte adicional de nutrientes para processos fermentativos, particularmente na forma de fosfato de amônio (Deschamps et al., 1996).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram rendimentos na hidrólise enzimática muito próximos apesar da diferença nas condições de operação no pré-tratamento com os dois reagentes. Quando o bagaço foi pré-tratado com ácido sulfúrico, obteve-se rendimento de 91% aproximadamente trabalhando a 100°C, 15 minutos de reação e com 0,5%p/v de H_2SO_4 e deslignificado com 1%p/v NaOH por 1h a 100°C. Para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico o rendimento foi de aproximadamente 88% quando o pré-tratamento foi realizado a 140°C por 120 minutos de reação e 0,5%p/v H_3PO_4 , sendo posteriormente deslignificado com 1%p/v NaOH por 1h a 100°C. De acordo com os resultados obtidos o pré-tratamento com ácido fosfórico requer maior temperatura de reação (140°C), se comparado com o pré-tratamento com ácido sulfúrico (100°C), e maior tempo de reação, sendo que para o pré-tratamento com ácido sulfúrico são necessários 15 minutos e para o pré-tratamento com ácido fosfórico 120 minutos.

Assim, a utilização de ácido fosfórico no pré-tratamento propicia a produção de materiais celulósicos de alta acessibilidade, paralelamente aos índices de recuperação dos componentes do bagaço. Em consequência, o uso de ácido fosfórico poderá se consolidar como uma alternativa atraente para a otimização de processos de sacarificação e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol como combustível. A figura 4.27 mostra a aparência do bagaço depois do pré-tratamento com ácido fosfórico e deslignificação com hidróxido de sódio.



Figura 4.27. Bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio. A- bagaço sem pré-tratar, B- bagaço pré-tratado com ácido fosfórico, C- bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio.

4.7. Comparação com outros estudos de pré-tratamentos ácidos

A atividade durante a conversão enzimática da fração celulósica nos resíduos sólidos pré-tratados está estreitamente relacionada às propriedades estruturais do material lignocelulósico, por isto o pré-tratamento com ácidos diluídos pode ser empregado a vários níveis com o objetivo de ajustar ditas propriedades. Numerosas barreiras podem atuar reduzindo o desempenho da sacarificação enzimática. Por exemplo, o ataque da celulase é iniciado principalmente sobre a região amorfa da celulose, devido ao fato da cristalinidade dos resíduos afetar negativamente a eficiência do contato entre a enzima e a celulose. Além disso, a lignina ainda presente nos sólidos pré-tratados é um fator importante que afeta a hidrólise enzimática. A lignina é considerada como um adsorvente, o qual diminui a quantidade de celulase disponível para a reação hidrolítica (Berlin et al, 2006).

Segundo vários autores que utilizaram ácido diluído no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, bons resultados foram atingidos na remoção da fração hemicelulósica, mas não da lignina, apresentando rendimentos altos na solubilização dos seus açúcares monoméricos, tendo como componente principal a xilose (Neureiter et al, 2002; Vasquez et al, 2007).

Um (2003) estudou o efeito dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico e ácido fosfórico na hidrólise enzimática dos resíduos de milho a temperaturas moderadas e baixas concentrações de ácido, com o objetivo de diminuir custos do catalisador, da neutralização dos ácidos e da construção do reator. O pré-tratamento com ácido sulfúrico solubilizou efetivamente a porção, mas a deslignificação foi só de 22%. Quando os resíduos de milho foram tratados com ácido fosfórico, a degradação da hemicelulose e da lignina foram muito baixas.

Vários estudos indicaram que o pré-tratamento com ácidos diluídos redistribui a estrutura química da lignina o que pode resultar em uma inibição significativa na taxa da hidrólise (G-L Guo et al, 2009).

Yang e Wyman (2004) compararam os sistemas em batelada com os sistemas *flowthrough* para o pré-tratamento com 0,1%p/p ácido sulfúrico a temperaturas entre

160°C e 220°C. No estudo concluíram que uma grande fração da lignina reage a produtos solúveis que facilitam a formação de novas espécies insolúveis, se é usado um sistema em batelada. Além disso, o sistema em batelada parece impulsionar a dissolução e precipitação da lignina. O sistema *flowthrough* pelo contrário remove a lignina antes que ela se condense sobre a biomassa, aumentando a acessibilidade da celulose e ainda mais sua digestibilidade.

O estudo de deslignificação realizado por Ponte Rocha (2009) mostrou um processo alternativo para a produção de etanol através da fermentação de hidrolisados de bagaço de caju pré-tratado com ácido sulfúrico e deslignificado com hidróxido de sódio, além de conseguir hidrolisar as xilanas restantes sem a adição de enzimas específicas para estes componentes. Da mesma forma, o trabalho de Rocha (2002) comprovou que a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar com NaOH é um processo importante na remoção da lignina, produzindo uma matéria prima com alta quantidade de celulose e baixo teor de polioses.

Neste estudo, o bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e fosfórico diluídos mostrou resultados bons na solubilização da hemicelulose presente e na remoção da lignina, como pode ser visto nas tabelas 4.3a e 4.3b. No entanto, os rendimentos na hidrólise enzimática foram muito baixos, o que pode ser atribuído à condensação da lignina no bagaço pré-tratado em presença de ácidos. Por isso, para melhorar a susceptibilidade na hidrólise enzimática, foi adicionada a etapa de deslignificação com hidróxido de sódio. O hidróxido de sódio mostrou ser um agente muito eficiente na remoção da lignina remanescente no bagaço pré-tratado com ácidos e dos subprodutos formados, permitindo atingir rendimentos elevados na etapa de hidrólise.

4.8. Comparação dos resultados com os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino e cal

O Laboratório de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas vem desenvolvendo pesquisas em pré-tratamentos químicos do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de açúcares fermentescíveis. Entre eles estão os pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído e ácido fosfórico diluído, peróxido de hidrogênio alcalino e cal. A comparação

destes pré-tratamentos permite ter uma visão global em termos de disponibilidade, eficiência e segurança.

Entre todos os métodos de pré-tratamento, o pré-tratamento com ácido diluído tem sido estudado amplamente por que ele é eficaz e barato. O pré-tratamento com ácido sulfúrico pode efetivamente solubilizar a hemicelulose em açúcares monoméricos (arabinose, galactose, manose e xilose) melhorando assim a conversão da celulose. Comparado com outros métodos é especialmente útil na conversão de xilana em xilose, que pode ser fermentado a etanol por muitos microorganismos, ainda que com baixa eficiência (Mac Millan et al, 1996). O ácido fosfórico é um reagente muito conveniente por ser eficiente e não corrosivo. Ele é um pré-tratamento que decompõe a estrutura cristalina da celulose, além de poder ser reciclado e reusado. Portanto, o ácido fosfórico é um agente potencial para gerar altos rendimentos na produção de açúcares fermentescíveis.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, aumenta enormemente a susceptibilidade para a hidrólise enzimática e conseqüentemente a produção de etanol. O hidróxido de cálcio tem sido bastante usado como agente de pré-tratamento para aumentar a digestibilidade enzimática de resíduos lignocelulósicos tais como o bagaço de cana, palha de trigo, palha de milho, entre outros resíduos agroindustriais (Chang et al., 1997 e 1998, Kaar et al., 2000). Várias pesquisas têm utilizado a cal como um dos reagentes com grande potencial para o pré-tratamento da biomassa por ser um reagente de baixo custo e segurança para manipulação, apesar de apresentar menor solubilidade e ser mais fraca quando comparada com outras bases (Chang et al., 1998).

No trabalho de tese desenvolvido no LEPFE por Rabelo (2007) o bagaço de cana de açúcar foi obtido por meio de colheita manual pela Usina São Luiz – Dedini S/A agroindústria da fazenda São Luiz – Setor A, da zona rural da cidade de Pirassununga, Estado de São Paulo. Neste trabalho verificou-se que a máxima liberação de glicose foi obtida a 25°C, com concentração de H_2O_2 de 7,355% por 1 h em pH 11,5. Os resultados de massa de ART e glicose após 48 h de hidrólise a 50°C e pH 4,8 foram 0,4899 g/g biomassa bruta seca e 0,3740 g/g biomassa bruta seca, respectivamente. A massa de glicose corresponde a um rendimento de 84,07 %. Estudos posteriores mostraram que é

possível chegar a rendimento de 100% com carga enzimática otimizada de 3,5 FPU/g de celulase e 25 CBU/g de β -glicosidase. Além disso, foi estudado também o pré-tratamento com cal, sendo as condições ótimas a 90°C e uma concentração de cal de 0,4 g/g de bagaço e por 90h. Foram obtidos rendimentos de 90,8% na hidrólise enzimática com carga enzimática otimizada, de 50FPU/g de celulase e 25 CBU/g de β -glicosidase (Rabelo, 2010).

Tem sido relatado que a estrutura da parede celular e os componentes de uma mesma planta podem mudar significativamente dependendo da época e da duração do cultivo, apresentando características diferentes que podem influenciar na sua digestibilidade (Hartley e Jones, 1977; Hopkins, 1999). O material deste trabalho foi fornecido por meio de colheita mecanizada e não queimado, pelo contrário o material dos trabalhos de Rabelo (2007, 2010) foi fornecido por meio de colheita manual e queimado. Fazendo uma comparação no rendimento da hidrólise enzimática, todos os pré-tratamentos apresentaram altos desempenhos a condições totalmente diferentes de temperatura, tempo e concentração de reagente.

4.9. Experimentos com variação na carga enzimática

A carga enzimática e as características estruturais estão intimamente interligadas durante a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, ou seja, biomassas com características estruturais mais acessíveis para a enzima necessitarão menores cargas de enzima para atingir elevados teores de açúcares, enquanto, a digestibilidade da biomassa com características recalcitrantes pode ser melhorada, em certa medida, com altas cargas enzimáticas. Devido ao alto preço das enzimas, reduzir a quantidade de enzima necessária para atingir altos rendimentos a partir da biomassa se torna um dos alvos da hidrólise enzimática. Este estudo analisará o efeito de carga enzimática para as condições ótimas de pré-tratamento com o fim de encontrar a carga enzimática ideal para obter maior produção de açúcares fermentescíveis.

4.9.1. Planejamento 2² + configuração estrela para a obtenção de dados cinéticos do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com hidróxido de sódio

No trabalho de Garcia (2009) e Fuentes (2009) que estudaram os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino e cal, respectivamente, foram feitas análises da hidrólise enzimática com variação na concentração de substrato de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% mantendo fixa a carga enzimática. Nos dois trabalhos notou-se que o rendimento diminui com o aumento da concentração de substrato, devido à maior dificuldade na transferência de massa, o que também provavelmente dificulta a adsorção das enzimas presentes sobre o substrato. Portanto, naqueles trabalhos escolheu-se trabalhar com concentração de sólidos de 3%, que apresenta um valor intermediário de conversão em glicose sem levar a uma concentração de glicose em g/L muito baixa no hidrolisado. Neste trabalho a mesma concentração de bagaço será utilizada para que os resultados possam ser comparados aos dois trabalhos anteriores.

Assim, a concentração de sólidos foi fixada em 3% (p/v) (3 gramas de bagaço pré-tratado nas condições ótimas em 100 mL de solução). Ao bagaço pesado foram adicionados 100 mL de tampão citrato com 0,07 g de azida. O meio reacional foi ajustado até pH 4.8. As condições de temperatura e agitação foram mantidas a 50 °C e 150 rpm. A cada ensaio foram adicionadas diferentes concentrações de celulase e β -glicosidase de acordo com um planejamento composto central 2² com três pontos centrais. Os valores de celulase e β -glicosidase considerados foram os mesmos dos trabalhos de Garcia (2009) e Fuentes (2009).

A tabela 4.19 mostra a matriz de planejamento. Na primeira e na terceira colunas encontram-se expressas as concentrações de celulase e β -glicosidase por grama de bagaço pré-tratado, na segunda e na quarta colunas estão mostradas as concentrações equivalentes em termos de concentração de enzima por litro de solução. Alíquotas foram retiradas aos 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h de reação e a reação foi interrompida com o aumento na temperatura até 80 °C durante 10 min, sendo realizadas as leituras em HPLC para a quantificação dos açúcares (Garcia, 2009; Fuentes, 2009).

Tabela 4.19. Matriz de planejamento composto central para a variação de carga enzimática

Ensaio	celulase (FPU/g)	celulase (FPU/L)	β - glicosidase (CBU/g)	β - glicosidase (CBU/L)
1	5,83	175	7,33	220
2	5,83	175	42,66	1280
3	25,83	775	7,33	220
4	25,83	775	42,66	1280
5	1,66	50	25	750
6	30	900	25	750
7	15,83	475	0	0
8	15,83	475	50	1500
9 (C)	15,83	475	25	750
10 (C)	15,83	475	25	750
11 (C)	15,83	475	25	750

Pode-se notar, avaliando a Tabela 4.20 que o melhor resultado está no ensaio 6, onde as concentrações de celulase e β -glicosidase são 900 FPU/L e 750 CBU/L, respectivamente. Estes valores correspondem a concentrações de 30 FPU/g biomassa de celulase e 25 CBU/g biomassa de β -glicosidase. O ensaio 3 (25,83 FPU/g de celulase e 7,33 CBU/g de β -glicosidase) também levou a altas concentrações de glicose,. O menor valor de rendimento foi no ensaio 5, que foi realizado com a menor concentração de celulase apresentando rendimento de 28,46%.

Tabela 4.20. Matriz de planejamento composto central para a variação de carga enzimática

Ensaio	Celulase (FPU/g)	Celulase (FPU/L)	β - glicosidase (CBU/g)	β - glicosidase (CBU/L)	Glicose (g/L)	%Rend
1	5,83	175	7,33	220	8,28	65,86
2	5,83	175	42,66	1280	8,11	64,51
3	25,83	775	7,33	220	11,95	95,10
4	25,83	775	42,66	1280	11,31	90,00
5	1,66	50	25	750	3,58	28,46
6	30	900	25	750	12,21	97,17
7	15,83	475	0	0	8,80	70,02
8	15,83	475	50	1500	10,48	83,36
9 (C)	15,83	475	25	750	10,52	83,70
10 (C)	15,83	475	25	750	10,28	81,76
11 (C)	15,83	475	25	750	10,00	79,53

Os dados cinéticos também foram avaliados através dos perfis de celobiose, glicose, xilose e arabinose em função do tempo, que podem ser vistos nas Figuras 4.28 a 4.31. Os valores dos dados cinéticos em g/L e em g/g se encontram em tabela apresentada no Apêndice C.

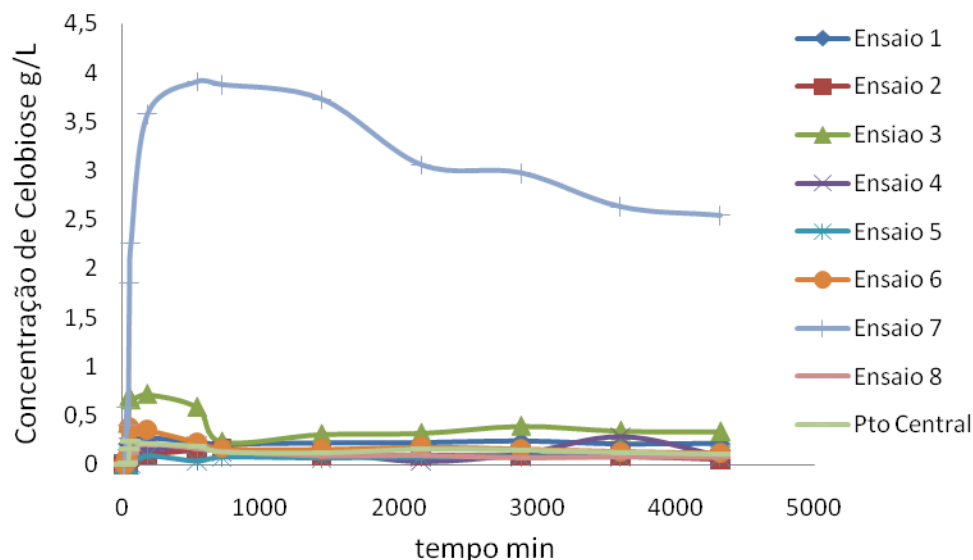


Figura 4.28. Concentrações de celobiose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática

Com análise do perfil de celobiose (Figura 4.28), observa-se que quando não foi adicionada carga de β -glicosidase (ensaio 7), grande quantidade de celobiose é acumulada no meio reacional, já que esta enzima é responsável pela conversão de celobiose em glicose. Este ensaio mostra a importância da adição de β -glicosidase para aumentar os rendimentos na hidrólise e diminuir a inibição causada pela celobiose. Por outro lado, nota-se que nos outros ensaios praticamente não houve acúmulo de celobiose, o que mostra que concentrações relativamente baixas desta enzima são suficientes. O ensaio 3, com carga relativamente alta de celulase e carga baixa de β -glicosidase (7,33 CBU/g bagaço) foi o segundo ensaio com maior acúmulo de celobiose, mas este acúmulo foi pouco significativo.

Ao considerar a Figura 4.29 (perfil de glicose) nota-se que para o ensaio 5, onde foi empregada pouca quantidade de celulase e alta carga de β -glicosidase, os resultados foram inferiores aos demais, demonstrando que a celulase é de vital importância quando se deseja altos teores de glicose, uma vez que esta enzima é responsável pela conversão

de celulose em celobiose. Para o ensaio 7, mesmo sem adição de β -glicosidase, os resultados foram razoáveis quando se deseja obter glicose, mostrando um rendimento de 70%.

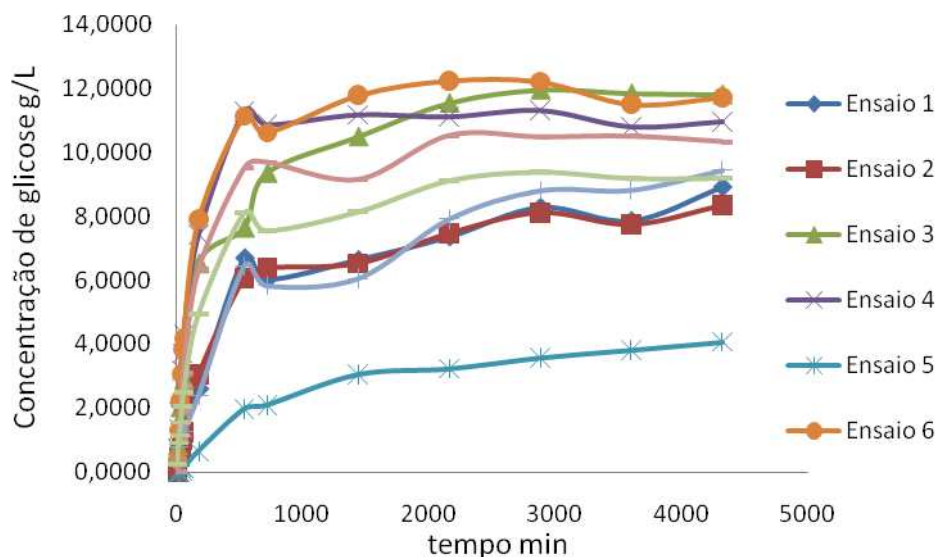


Figura 4.29. Concentrações de glicose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática

Ao se comparar os perfis de glicose para os ensaios 3 (25,83 FPU/g de celulase e 7,33 CBU/g de β -glicosidase, respectivamente) com os do ensaio 6 (30 FPU/g e 25 CBU/g de celulase e β -glicosidase, respectivamente), que tiveram os maiores rendimentos, percebe-se que no ensaio 3 a conversão final foi atingida mais rapidamente (para 1440 minutos, ou 24h a concentração final de glicose havia sido atingida no ensaio 6 e para o ensaio 3 a concentração final foi atingida em torno de 3000 minutos, ou 50h). No entanto, a concentração final de glicose obtida no ensaio 6 foi praticamente a mesma obtida com uma carga de β -glicosidase bem menor no ensaio 3.

As Figuras 4.30 e 4.31 mostram o comportamento das concentrações de xilose e arabinose ao longo do tempo. Nota-se um comportamento semelhante para os perfis de xilose e de arabinose, que estão diretamente relacionados à hemicelulose. As maiores concentrações de xilose e de arabinose foram para os ensaios 3, 4, 6.

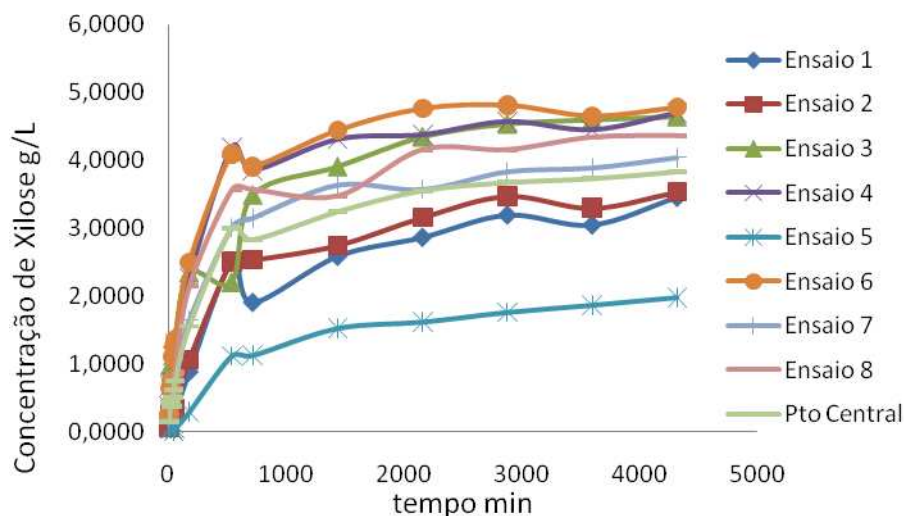


Figura 4.30. Concentrações de xilose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática

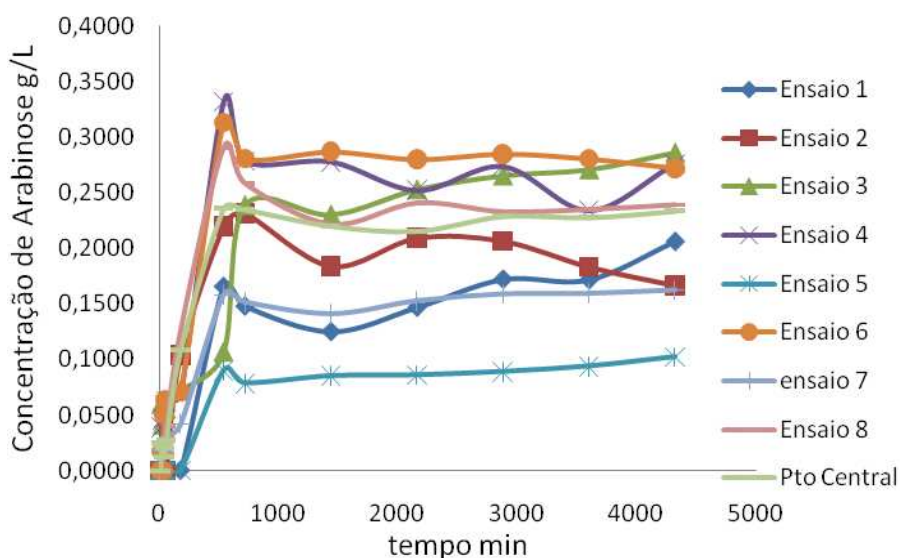


Figura 4.31. Concentrações de arabinose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática

4.9.2. Análise estatística do rendimento em glicose na hidrólise

Os dados da matriz de planejamento foram analisados utilizando-se o programa *Statistica* versão 7.0. A Figura 4.32 mostra o gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e β -glicosidase para o rendimento em glicose.

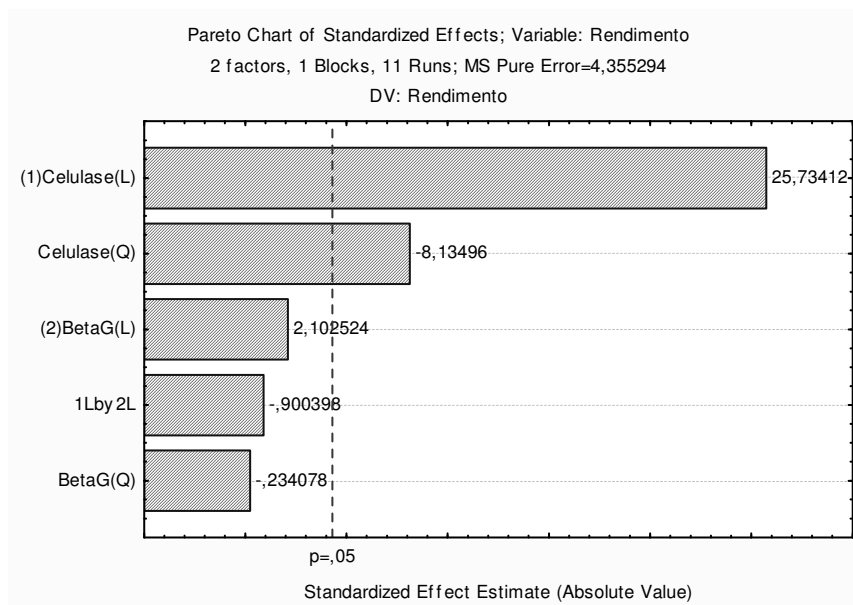


Figura 4.32. Gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e β -glicosidase para o rendimento em glicose.

Nota-se que só o efeito da celulase (linear e quadrático) foi significativo, considerando-se erro puro e nível de confiança de 95% (p valor <0.05). Pode-se ver, ainda, que o efeito linear é positivo e efeito quadrático é negativo.

A Tabela 4.21 mostra a Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento. Pode-se notar que o modelo estatístico para este planejamento é significativo, pois passa os dois testes F. O valor de F calculado é maior do que o tabelado na verificação da significância estatística da regressão e menor do que o tabelado no teste de falta de ajuste do modelo, embora neste teste o modelo quase não passe, devendo seus resultados ser avaliados com cuidado.

Tabela 4.21. Análise de variância (ANOVA) do modelo para o planejamento estrela

F variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Teste F
Regressão R	3194,47	2	1597,23	25,38
Resíduos r	503,39	8	62,92	
Falta de ajuste faj	494,68	6	82,45	18,93
Erro puro	8,71	2	4,36	
Total	3697,86	10		

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*F(tab.)5,5 = 5,05 no nível de 95% para a regressão

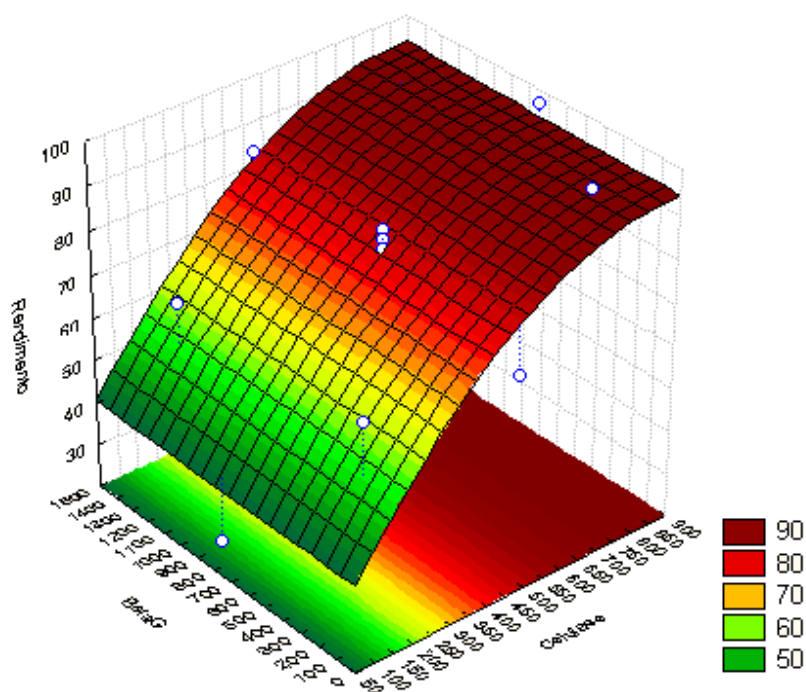
*F(tab.)3,2 = 19,16 no nível de 95% para a falta de ajuste

Tabela 4.22. Efeitos principais e das variáveis para o planejamento estrela com variação na carga enzimática

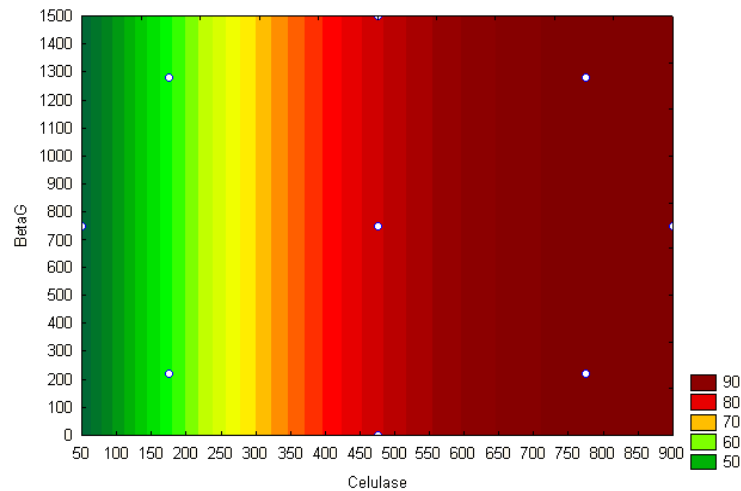
	Efeito	Desvio padrão	Intervalo de confiança -95%	Intervalo de confiança +95%	Coefficiente do modelo
Media	81,4666	0,876688	77,6945	85,23869	81,46660
Celulase(L)	37,9755	1,475685	31,6261	44,32482	18,98773
Celulase(Q)	-14,1675	1,678729	-21,3904	-6,94446	-7,08373

A equação 7 mostra o modelo que foi obtido com os valores dos coeficientes significativos tomados da tabela 4.22. Na equação $X1$ é a concentração celulase, codificada..

$$\%Rendimento = 81,4666 + 18,9877X1 - 7,08373(X1^2) \quad (7)$$



(a)



(b)

Figura 4.33. Superfície de resposta (a) e curva de nível descrita pela equação 7.

Para quantificar o valor ótimo da concentração de celulase, o modelo da equação 7 é derivado e igualado a zero.

$$\frac{\partial(\% \text{ Rend.})}{\partial(X1)} = 18,9877 - 2 * 7,0837X1 = 0 \quad (8)$$

$$X1 = -1,3402$$

Decodificando a variável X1, temos que:

$$X1 = \frac{\text{celulase} - 15,83}{25,83 - 15,83} = 29,232 \text{ FPU/g}$$

4.9.3. Carga enzimática mínima

Embora os resultados da análise estatística apontem para uma concentração ótima de celulase de 29, 23 FPU/g e indiquem que a β -glicosidase não apresenta influência estatisticamente significativa, nota-se ao analisar os dados da tabela 4.20 que se não houver adição de β -glicosidase o rendimento é mais baixo e sobra celobiose. Escolhe-se então, como melhor condição o ensaio 6, com concentração de celulase de 30 FPU/g e de β -glicosidase de 25 CBU/g, com rendimento de 97,17%. O ensaio 3 também apresentou alto rendimento e é uma opção para se minimizar o uso de enzimas, com 25,85 FPU/g de celulase e 7,33 CBU/g de β -glicosidase.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

- A composição do bagaço de cana-de-açúcar usado neste trabalho apresentou valores semelhantes com os citados na literatura, tendo a glucana como o componente de maior quantidade.
- O uso de ácidos diluídos leva à solubilização de parte da lignina, mas a quantidade que sobra ainda prejudica a etapa de hidrólise, levando a baixos rendimentos.
- A eficiência do pré-tratamento não é determinada apenas pela remoção da hemicelulose e da lignina, mas também é importante levar em conta as alterações na estrutura do material causada pelo reagente.
- Ácido sulfúrico usado como agente no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar solubiliza a xilana e uma pequena parte da lignina, além de redistribuir a estrutura química da lignina remanescente no bagaço.
- O desempenho da hidrólise enzimática melhorou significativamente quando o bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e fosfórico foi deslignificado com hidróxido de sódio, obtendo-se rendimentos elevados na produção de glicose.
- No pré-tratamento com ácido sulfúrico verificou-se que nos ensaios realizados a máxima produção de glicose foi obtida a 100°C, 15 min e 0,5%p/v H_2SO_4 , quando a deslignificação foi feita com o uso de 1%p/v NaOH , 1h e 100°C. Atingiu-se um rendimento de aproximadamente 92% na hidrólise, usando concentrações de enzima de celulase de 15 FPU/g e de β -glicosidase de 7,5 CBU/g.
- No pré-tratamento com ácido fosfórico verificou-se que nos ensaios realizados a máxima produção de glicose foi obtida a 140°C, 120 min e 0,5%p/v H_3PO_4 , quando a deslignificação foi feita com o uso de 1%p/v NaOH , 1h e 100°C. Atingiu-se um rendimento de aproximadamente 88% na hidrólise, usando

concentrações de enzima de celulase de 15 FPU/g e de β -glicosidase de 7,5 CBU/g.

- O uso de soluções diluídas de ácido fosfórico como catalisador, comparativamente aos procedimentos que utilizam ácidos mais fortes como o ácido sulfúrico, apresentam menor efeito destrutivo sobre as pentoses, com menor acúmulo de furfural no meio de reação. Este ácido não promove a corrosão interna dos equipamentos e pode constituir fonte adicional de nutrientes para processos fermentativos.
- Em consequência, o uso de ácido fosfórico poderá se consolidar como uma alternativa atraente para a otimização de processos de sacarificação e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol como combustível.
- Melhoras no rendimento em glicose na hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado com NaOH são obtidas trabalhando-se com maiores concentrações de enzimas. Trabalhando-se com concentração de celulase de 30 FPU/g e de β -glicosidase de 25 CBU/g, obtém-se rendimento de 97,1%. Rendimento de 95,10%, apenas um pouco mais baixo, é obtido com uma carga de celulase de 25,85 FPU/g e de β -glicosidase de 7,33 CBU/g.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação de características físicas, químicas e estruturais da lignina proveniente do bagaço pré-tratado para que seja possível seu aproveitamento.
- Estudo da otimização da etapa de deslignificação com hidróxido de sódio ou outros álcalis e determinação da cinética deslignificação
- Quantificação da formação de compostos inibidores no hidrolisado para posterior uso como meio da fermentação, tais como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).
- Realização de estudos de pré-tratamentos com ácidos diluídos utilizando reatores *flowthrough* para determinar a influência na remoção da lignina.
- Comparação do rendimento na hidrólise enzimática usando pré-tratamentos ácidos com os rendimentos na hidrólise usando pré-tratamentos organosolv.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR, J.A. RAMÍREZ, G. GARROTE AND M. VÁZQUEZ. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering* 55, pp. 309–318, 2002.
2. ALVES L. A, M.G.A. FELIPE, J.B.A. SILVA, S.S. SILVA AND M.R. PRATA. Pretreatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 70–72, pp. 89–98, 1998.
3. ALVES L. A., M. VITOLO., M.G.A. FELIPE AND J.B.A. SILVA. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of *Candida guilliermondii* as a function of different treatments of sugarcane bagasse hydrolysate employing experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.98–100, pp. 403–413, 2002.
4. ARAUJO, G. C., WANG, D. I. C. Production of biomass from enzymatic hydrolysate of agricultural waste. *J ferment. Technol*, v58, pp 399-401, 1980.
5. BARROS NETO, B., SCARMIN, I. S. e BRUNS, R. E. Como fazer experimentos, 2003, 2 ed. Campinas, SP: Editado por UNICAMP.
6. BERLIN A., BALAKSHIN M. AND GILKES N, KADLA J. Inhibition of cellulase, xylanase and B-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J Biotechnol*, v.125. p.198–209, 2006.
7. BIANCHI, MARIA LUCIA. Polpação da palha de milho, utilizando-se diferentes processos organosolv. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese (Mestrado).

8. BRINK, D. L. Method of treating biomass material. US Patent 5.221.357.
9. BRINK, D. L. Method of treating biomass material. US Patent 5.366.558.
10. BUSTOS G., J.A. RAMÍREZ., G. GARROTE AND M. VÁZQUEZ. Modeling of the hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.104, pp. 51–68, 2003.
11. CAMUS, J. M., LABORDA, J. A. Biocarburantes Líquidos: Biodiésel y Bioetanol. P 76-81, 2006.
12. CHANDEL, A.K., KAPOOR, R.K., SINGH, A., KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol*, v.98, p.1947–1950, 2007.
13. CHANG, V. S., BURR, B., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.63-65, p.3-19, 1997.
14. CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.74, p.135–159, 1998.
15. CHEN, R. AND LEE, Y. Y. Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.63, p.435-438, 1997.
16. CHENG, K.K., CAI, B.Y., ZHANG, J.A., LING, H.Z., ZHOU, Y.J., GE, J.P., XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochem. Eng J*, v.38, p.105–109, 2008.
17. CONTIERO, JONAS. Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 1992. Tese (Doutorado).

18. COSTA, J. L. M. Liquefação direta de lixívia negra e de lignina da hidrólise ácida de eucalipto em reatores batelada e contínuo. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1989. Tese (Doutorado).
19. CRAWFORD, D. L., McCOY, E., HARKIN, J. M., JONES, P. Production of microbial protein from waste cellulose by *thermomonospora fusca*, a thermophilic actinomycete. *Biotechnology and bioeng.* v.15, p.833-843, 1973.
20. DALE, B. E., LONG, C. K., PHAM, T. K., ESQUIVEL, V.M., RIOS, I. NAD LATIMER, V. M. Hydrolysis of lignocellulosics at low enzyme levels: Applications of the AFEX process. *Bioresource Technology.* v.56, p.111-116, 1996.
21. DATTA, R. Energy requirements for lignocellulose pretreatment processes. *Process Biochem.* June/July, p.16-19, 1981.
22. DEKKER, M. AND MARK. R. E. Handbook of physical and mechanical testing of paper and paperboard. v.1, p.459, 1983.
23. DESCHAMPS, F. C., RAMOS, L. P. AND FONTANA, J. D. Pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced ruminal digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57/58, P. 171-182, 1996.
24. DRAPCHO, C.M., NHUAN, N.P., WALKER, T.H. *Biofuels Engineering Process Technology*. Mc Graw Hill Companies, Inc, 2008.
25. DUARTE, HUMBERTO CONRADO. Hidrólise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1989. Tese (Doutorado).
26. DUNLAP, C. E., THOMSON, J. AND CHIANG, C.L. Treatment processes to increase to increase cellulose microbial digestibility. *AIChE. Symp. Series* 158. 72: 58-63. 1976.

27. FAITH, W. L. AND HALL, J.A. Ethyl alcohol from waste wood by a modified scholar process. Chemical Engineering News, v.22, p.525-526, 1944.
28. FAN, L. T., LEE, H. Y. AND BEARDMORE, D. H. Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. Adv. Biochem. Eng. v.14, p.101-117, 1980.
29. FAN, L. T., LEE, Y. H. AND GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Adv. Biochem. Eng., v.23, p.157-187, 1982.
30. FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. pp 613. Berlin and New York, 1984.
31. FUENTES, L, G. Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).
32. GÁMEZ S, J.A. RAMÍREZ, G. GARROTE AND M. VÁZQUEZ. Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure, Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.52, pp. 4172–4177, 2004.
33. GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J., RAMÍREZ, J. A. AND GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. Journal of Food Engineering, v.74, p.78-88, 2006.
34. GAN, Q., S.J. ALLEN. AND G. TAYLOR, Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. Process Biochemistry, v.38, p.1003-1018, 2003.
35. GARCIA, D. R. Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de

- Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).
36. GARROTE, G., DOMINGUEZ, H. AND PARAJO, J.C. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *J. Food Eng.* v.52, p.211–218, 2002.
 37. GHARPURAY, M. M., LEE, Y. H. FAN, L. T. Structural modification of lignocellulosics by treatment to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* v.26, p.426-433, 1983.
 38. GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl. Chem.*, v. 59, p. 257-268, 1987.
 39. GIA-LUEN GUO, DENG-CHIEH HSU, WEN-HUA CHEN, WEI-HSI CHEN, WEN-SONG HWANG. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme and Microbial Technology.* 45, 80-87, 2009.
 40. GOLDSTEIN, I. S., EASTER, J. M. An improved process for converting cellulose to ethanol. *TAPPI Journal.* 75: 135-140, 1992.
 41. GOMEZ, RAUL JORGE HERNAN. Sacarificacao da hemicelulose do bagaco de cana-de-acucar e sua fermentacao por *pachysolen tannophilus*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agricola, Universidade Estadual de Campinas, 1985. Tese (Doutorado).
 42. GONG, C.S. CHEN AND L.F. CHEN. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate for ethanol production by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.39/40, p.83–88, 1993.
 43. GONÇALVES, A. R. Oxidação de ligninas e modelos de lignina com oxigenio molecular em meio ácido. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese (Doutorado).

44. GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* v.45, p.820–831, 2005.
45. GROHMANN, K., TORGET, R., HIMMEL, M. Diluted acid pretreatment of biomass at high solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering Symposium.* 17: 59-80, 1985.
46. GRUPO DE PAISES LATINOAMERICANOS Y DEL CARIBE EXPORTADORES DE AZUCAR, GEPLACEA. Manual de los derivados de la caña de azucar. Grupo de paises latinoamericanos y del caribe exportadores de azucar. p 447. 1990.
47. HARTLEY, R.D. AND JONES, E.C. Phenolic components and degradability of cell walls of grass and legume species. *Phytochemistry.* v.16, p.1531–1534, 1977.
48. HARRIS, E.E., BEGLINER, E., HAJNY, G. J., SHERRARD, E. C. Hydrolysis of wood. Treatment with sulfuric acid in a stationary digester. *Industrial Engineering Chemistry.* v.37, p.12-23, 1945.
49. HARRIS, J. F. Acid hydrolysis and dehydration reactions for utilizing plant carbohydrates. *Appl. Polym. Symp.* v.28, p.131, 1975.
50. HERNÁNDEZ-SALAS, J.M., VILLA-RAMÍREZ, M.S., VELOZ-RENDÓN, J.S., RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N., GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A., PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A., TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresour. Technol.* v.100, p.1238–1245, 2009.
51. HOLTZAPPLE, M. T. The pretreatment and enzymatic saccharification of poplar wood. Pennsylvania: Graduate Faculties, University of Pennsylvannia; 1981. Tese (Doutorado).

52. HOPKINS, W.G. Introduction to Plant Physiology, second ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 12, 1999.
53. ISRAILIDES, C.J., GRANT, G. A., HAN, Y. W. Sugar level, fermentability, and acceptability of Straw treated with different acids. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.36, p.43-46, 1978.
54. JAYNE, G. High Polymers, Vol V, 2nd Ed., cellulose and Cellulose derivatives, Part IV. Wiley-Interscience, New York. 1979.
55. KAAR, WE., GUTIERREZ, CV. AND KINOSHITA, CM. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. Biomass and Bioenergy, v.14, p. 277-287, 1998.
56. KAAR W. E. AND HOLTZAPPLE M. T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover. Biomass Bioenergy v.18, p.189–199, 2000.
57. KINGSLEY C. NLEWEM, MARVIN E. THRASH JR. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. Bioresource Technology, v.101, p.5426–5430, 2010.
58. KNAUF, M. AND MONIRUZZAMAN, M. Lignocelulosic biomass processing: a perspective. International sugar journal. v.106, p.147-150, 2004.
59. LASER, M., SCHULMAN, D., ALLEN, S. G., LICHWA, J., ANTAL Jr, M. J. AND LYND, L. R. A. Comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. Bioresource Technology, v.81, p.33-44, 2002.
60. LAUREANO-PEREZ, L., TEYMOURI, F., ALIZADEH, H. AND DALE, B.E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Appl. Biochem. Biotechnol., 1081–1099, 2005.

61. LEE, H. Y., FAN, L. T., BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structure features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioenerg.* 22, suppl. 1, 27-48, 1980.
62. LEE, D., YU, A. H. C. AND WONG, K. K. Y. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.45/45, p.407–415, 1994.
63. LESSA DOS SANTOS, G. AND POLEDNA, S. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2005.
64. LI, C., M. YOSHIMOTO, N. TSUKUDA, K. FUKUNAGA AND K. NAKAO. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation. *Biochemical Engineering Journal*, v.19, p.155-164, 2004.
65. LINKO, Y. Y. AND JAVANAINEN, P. Simultaneous liquefaction, saccharification and lactic acid fermentation on barley starch..*Enzyme Microb Technol*, v.19, p.118, 1996.
66. LITCHFIELD, J. H. Microbial production of lactic acid. *Adv Appl Microbiol* v.42, p.45, 1996.
67. LUGAR, R., WOOLSEY, R.J. The new petroleum. *Foreign Affairs*, v. 78, p.88–102, 1999.
68. LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass. *Technology, Economics, the Environment, and Policy. Energy and Environment Management*, v.21, p.403-465, 1996.
69. LYND, L. R., ELANDER, R. T. AND WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57/58, p.741–761, 1996.

70. LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H. AND PRETORIOUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, p.506-577, 2002.
71. MARTÍNEZ, E.A., SILVA, S.S., SILVA, J.B.A., SOLENZAL, A.I.N., FELIPE, M.G.A. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. Guilliermondii*. *Process Biochem*, v.38, p.1677–1683, 2003.
72. MCMILLAN, J.D. Hemicellulose conversion to ethanol. In: Wyman, C.E. (Ed.), *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 287–313., 1996.
73. MEHAIA, M. A., CHERYAN, M. Production of lactic acid from sweet whey permeate concentrates. *Process Biochem*, v. 22, p.185, 1987.
74. MELAJA, A. J. AND HAMALAINEN, L. Process for making xylitol. US Patent 4.008.285 Dep. 18/6/75, Publ. 15/2/77.
75. MES-HARTREE, M., YU. E. K. C. AND REID, I. D. Suitability of aspenwood biologically delignified with *Phlebia remelosus* for fermentation to ethanol or butanediol. *Appl. Microbial. Biotechnol*, v.26, p.120-125, 1987.
76. MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R. AND DRESCHER R.. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production. Paper 103, BIOT Division, 225th American Chemical Society Meeting, New Orleans, 26 March 2003, 2003a.
77. MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., WELCH, G., et al. Corn fiber pretreatment scale up and evaluation in an industrial corn to ethanol facility. Paper 6A-04, 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Breckenridge, CO, 2003b.

78. NATHAN, S. M., PHILLIP, H., CHRISTINE M. AND MICHAEL, R. L.
Reaction Kinetics, Molecular Action, and Mechanisms of Cellulolytic Proteins.
Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, v.60, p.23-40, 1999.
79. NEUREITER, H. DANNER, C. THOMASSER, B. SAIDI AND R. BRAUN.
Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. Applied
Biochemistry and Biotechnology, v.98/100, pp. 49–58, 2002.
80. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden.
Standard Procedure n. 03; Determination of acid-insoluble lignin in biomass.
Golden, 1995. 2-13 p.
81. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden.
Standard Procedure n. 04; Determination of acid-soluble lignin in biomass.
Golden, 1996. 2-7 p.
82. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden.
Standard Procedure n. 06; Measurements of cellulase activities, 1996. 1-9 p.
83. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden.
Standard Procedure n. 10; Determination of extractives in biomass, 2005. 1-10
p.
84. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden.
Standard Procedure n. 02, 03, 17, 19; Determination of structural carbohydrates
and lignin biomass. Golden, 2006. 1-14 p.
85. NGUYEN, Q. A., TUCKER, M. P., KELLER, F. A., EDDY, F. P. Two- stage
diluted-acid pretreatment of softwoods. Applied Biochemistry and
Biotechnology, v.84/86, p.561-576, 2000.
86. PARAMESWARAN B, RAVEENDRAN S, REETA RANI S, SURENDER V,
LALITHA D, SATYA N, NOBLE K, RAJEEV K. SUKUMARAN, ASHOK P.
Bioethanol production from rice straw: An overview. Bioresource Technology,
v.101, p.4767–4774, 2010.

87. PONTE ROCHA M. V, SOARES RODRIGUES T. H., RIBEIRO DE MACEDO G., e GONÇALVES L. R. B. Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Alkali and Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnology*, v.155, p.407–41, 2009.
88. QUINTERO, J.A., MONTOYA, M.I., SÁNCHEZ, O.J., GIRALDO, O.H., CARDONA, C.A. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case. *Energy*, v.33, p.385–399, 2008.
89. RABELO, S.C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).
90. RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação (Doutorado).
91. RESTUTI, D., MICHAELOWA, A. The economic potential of bagasse cogeneration as CDM projects in Indonesia. *Energy Policy*, v.35, p.3952–3966, 2007.
92. REZZOUG, S. A., CAPART, R. Solvolysis and hydrotreatment of wood to provide fuel. *Biomass and Bioenergy*, v.11, p.343-352, 1996.
93. RIVERS, D. B., EMERT, G. H. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of bagasse and rice straw. *Biological waste*, v.26, p. 85-95, 1988.
94. ROBERTO, I. C., MANCILHA, I. M., SATO, S. Influence of kLa on bioconversion of rice straw hemicelluloses hydrolysate to xylitol. *Engineering, Knowle*, v.21, p.505-508, 1999.

95. ROBERTO, I.C., MUSSATTO, S.I., RODRIGUES, R.C.L.B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind. Crops Prod*, v.7, p.171–176, 2003.
96. ROCHA, G. J. M.1, BALCZÓ, N. K.1, VACARO, C.1, RODRIGUES, R. C. L. B. Obtainment and characterization of cellulose from sugarcane bagasse pretreated in acid medium for the synthesys of hidroxypropylmethyl cellulose. *Congresso iberoamericano de celulosa e papel*. 2002.
97. RODRIGUES, J. D. *Fisiología da Cana-de-Açúcar*. v.1, p.1-2. 1995.
98. RODRÍGUEZ-CHONG A, J.A. RAMÍREZ, G. GARROTE AND M. VÁZQUEZ. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: A kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, v.61, p.143–152, 2004.
99. ROLZ, C., LEON, R., ARRIOLA, M. C. Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbial*, v.52, p.607-661, 1986.
100. SAEMAN, J. F. Kinetics of wood saccharification hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in diluted acid at high temperature. *Industrial Engeniering Chemistry*, v.37, p.42-52, 1945.
101. SAHA, B., ITEN, L., COTTA, M., WU, V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v.40, p.3693-3700, 2005.
102. SAKAKIBARA, A., TAKEYAMA, H., MOROHOSHI, N. *Holzforchung*, v.20, p.45, 1966.
103. SANCHES, O. L., CARDONA, C. A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtencion a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*. V.30, p.671-678, 2005.

104. SARKANEN, K. V., LUDWIG, C. H. Lignins: occurrence, Formation, Structure and reactions. Wiley-Interscience, New York, 1971.
105. SARMIENTO, CECILIA RAMIREZ. Argamassa de cimento reforçada com fibras de bagaço de cana-de-açúcar e sua utilização como material de construção. Campinas: Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 1996. Tese (Mestrado).
106. SCHELL, D. J., FARMER, J., NEWMAN, M., McMILLAN, J. D. Diluted-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. Investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105, p.69-85, 2003.
107. SCHERRARD, E. C., KRESSMAN, F. W., Reviews of process in the United States prior to world War II. *Industrial Engineering Chemical*, v.37, p.5-8, 1945.
108. SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.; GONÇALVES, A. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. *Química. Nova*, v.24, p.247-25, 2001.
109. SEGEL, I. H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley. Cap I: Enzymes as biological catalysts, p 1-17, 1975.
110. SJOSTROM, E. Wood Chemistry, Fundamentals and applications. Academic Press. pp 1-20. New York, 1981.
111. SCHELL, D.J., NGUYEN, Q., TUCKER, M., BOYNTON, B. Pretreatment of softwood by acid-catalyzed steam explosion followed by alkali extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.70–72, p.17, 1998.
112. SILVA, F.T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral de bagaço de cana. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese (Doutorado).

113. SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Total Solids in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-6, 2005.
114. SOUZA, JOSEFINA APARACEIDA DE. Utilização de lignina para obtenção de formulação e liberação controlada do ácido 2-4 diclorofenoiciático. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1994. Tese (Mestrado).
115. SOUZA, O., SANTOS, I. E. Importância dos resíduos agropecuários na alimentação animal. Boletim pecuário. 2002.
116. STANEK, D. A. TAPPI, 41:601, 1958
117. SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 39/40, p. 587-600, 2002.
118. SZENGYEL, ZSOLT. Ethanol from wood cellulose enzyme production. Sweden: Dept. of Chemical Engineering 1, Lund University, 2000. Doctoral dissertation.
119. TORGET, R., HIMMEL, M., GROHMANN, K., 1992. Diluted acid pretreatment of two short-rotation herbaceous crop. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 34/35, p.115-123, 1992.
120. UM BYUNG-HWAN, M. NAZMUL KARIM, AND LINDA L. HENK. Effect of Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatments on Enzymatic Hydrolysis of Corn Stove. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 105-108, p.115-25, 2003.
121. VÁSQUEZ M. P, DA SILVA J, DE SOUZA M. B JR., PEREIRA N. JR. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous

- Saccharification and Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.136–140, p. 141-153, 2007
122. WANG, C. J., BAJPAI, R. K., LANNOTTI, E. L. Nondispersive Extraction for Recovery Lactic Acid. Appl Biochem Biotechnol, v.28/29, p.589, 1991.
 123. WEAST, R. C. Handbook of chemistry and physics. 67^a ed. Boca Raton. 441, 1986.
 124. WOOD, T. M.; BHAT, K. M.. Methods for measuring cellulase activities. Methods in enzymology, v.160, pp. 87-116, 1988.
 125. WYMAN, C. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. Annu. Rev. Energy Environ, v.24, p.189–226, 1999.
 126. YANG B AND WYMAN C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. Biotechnol Bioeng, v.86, p.88–98, 2004.
 127. YU, Z., ZHANG, H. Pretreatment of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Sacharomyces cerevisiae*. *Pichia* sp. YZ-1 and *zymonas mobilis*. Biomass and Bioenergy, v.24, p.257-262, 2003.
 128. ZHANG, D. X., CHERYAN, M. Starch to lactic acid in a continuous membrane bioreactor. Process Biochem, v.29, p.145-150, 1994.

APÊNDICE A
DADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE E ART DO PLANEJAMENTO 2³ COM ÁCIDO SULFÚRICO

Tabela A.1. Dados de concentração de glicose do planejamento 2³ com ácido sulfúrico

g glicose/g bagaço sem pré-tratar									
tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ponto central
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1	0,1425	0,0981	0,0678	0,0930	0,0924	0,0542	0,0574	0,0245	0,0351±0,0020
3	0,1289	0,1148	0,1058	0,1547	0,1318	0,1004	0,0841	0,0671	0,0684±0,0010
6	0,1781	0,1259	0,1564	0,1268	0,1752	0,1749	0,1094	0,0954	0,0913±0,0014
9	0,2884	0,1749	0,1328	0,1698	0,1953	0,1640	0,1487	0,1214	0,1007±0,0008
12	0,2799	0,2452	0,1725	0,2251	0,2541	0,2057	0,1728	0,1648	0,1726±0,0022
24	0,3457	0,2759	0,2349	0,2781	0,2831	0,2516	0,1908	0,1941	0,2479±0,0011
36	0,3657	0,2981	0,2587	0,3125	0,3487	0,2745	0,2188	0,2353	0,2961±0,0021
48	0,3806	0,3035	0,2872	0,3381	0,3563	0,3340	0,2359	0,2584	0,3323±0,0018
60	0,3483	0,2891	0,2792	0,3257	0,3429	0,3305	0,2289	0,2462	0,3291±0,0012
72	0,3542	0,3018	0,2860	0,3329	0,3514	0,3328	0,2317	0,2501	0,3263±0,0019

Tabela A.2. Dados de concentração de ART do planejamento 2³ com ácido sulfúrico

g ART/g bagaço sem pré-tratar									
tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ponto central
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1	0,1877	0,1551	0,1418	0,1520	0,1413	0,0944	0,0828	0,0490	0,0505±0,0015
3	0,2312	0,2078	0,2106	0,2598	0,2170	0,1925	0,1732	0,1185	0,1082±0,0011
6	0,2906	0,2506	0,2821	0,2896	0,2760	0,2778	0,2088	0,1885	0,1655±0,0020
9	0,4303	0,3591	0,3113	0,3421	0,3307	0,3077	0,2612	0,2457	0,211±0,0013
12	0,4088	0,4198	0,3812	0,3945	0,4294	0,3763	0,3240	0,3043	0,3146±0,0017
24	0,5313	0,4764	0,4668	0,4608	0,4360	0,4174	0,3331	0,3208	0,3847±0,0021
36	0,5767	0,5249	0,4801	0,4923	0,5641	0,4829	0,3871	0,3830	0,4713±0,0016
48	0,5960	0,5616	0,5354	0,5349	0,5925	0,5529	0,4348	0,4157	0,5272±0,0009
60	0,5615	0,5369	0,5204	0,5249	0,5713	0,5427	0,4156	0,3928	0,5183±0,0012
72	0,5692	0,5578	0,5323	0,5254	0,5828	0,5492	0,4501	0,3822	0,5031±0,0010

APÊNDICE B

DADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE E ART DO PLANEJAMENTO 2³ COM ÁCIDO FOSFÓRICOTabela B.1. Dados de concentração de glicose do planejamento 2³ com ácido fosfórico

g glicose/g bagaço sem pré-tratar									
tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	ponto central
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1	0,0148	0,0547	0,0147	0,0147	0,0478	0,0334	0,0194	0,0587	0,0485±0,0014
3	0,0671	0,0743	0,0387	0,0608	0,0581	0,0412	0,0287	0,1373	0,0843±0,0021
6	0,0932	0,0925	0,0741	0,0917	0,0932	0,0921	0,0654	0,1749	0,1108±0,0017
9	0,1058	0,1149	0,0902	0,1415	0,1247	0,1047	0,0762	0,2121	0,1356±0,0010
12	0,1582	0,1768	0,1376	0,2019	0,1943	0,1357	0,1574	0,2176	0,1902±0,0014
24	0,1924	0,1926	0,1742	0,2765	0,2487	0,1833	0,1926	0,2633	0,2458±0,0022
36	0,2381	0,2314	0,2488	0,3049	0,2947	0,2547	0,2364	0,3310	0,2952±0,0008
48	0,2758	0,2644	0,2943	0,3670	0,3530	0,2966	0,2806	0,3491	0,3301±0,0011
60	0,2687	0,2632	0,2898	0,3515	0,3479	0,2841	0,2779	0,3464	0,3284±0,0017
72	0,2743	0,2626	0,2911	0,3627	0,3521	0,2946	0,2800	0,3428	0,3299±0,0020

Tabela B.2. Dados de concentração de ART do planejamento 2³ com ácido fosfórico

g ART/g bagaço sem pré-tratar									
tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	ponto central
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1	0,0393	0,0804	0,0331	0,1138	0,0732	0,0582	0,0448	0,1534	0,0955±0,0008
3	0,0899	0,1384	0,0934	0,2378	0,1268	0,0726	0,0652	0,2964	0,1357±0,0012
6	0,1603	0,1948	0,1655	0,2930	0,1863	0,1895	0,1266	0,3507	0,2081±0,0021
9	0,1968	0,2407	0,2053	0,3625	0,2405	0,2205	0,1694	0,4150	0,2712±0,0024
12	0,3064	0,3316	0,2703	0,4368	0,3584	0,2606	0,2682	0,4044	0,338±0,0014
24	0,3844	0,3656	0,3544	0,4683	0,4275	0,3728	0,3475	0,4308	0,4221±0,0018
36	0,4862	0,4272	0,4666	0,5466	0,5327	0,4614	0,4296	0,5318	0,4906±0,0020
48	0,5360	0,4804	0,5356	0,6118	0,5998	0,5353	0,4965	0,5780	0,5368±0,0017
60	0,5226	0,4726	0,5282	0,5882	0,5866	0,5064	0,4912	0,5735	0,52426±0,0023
72	0,5354	0,4773	0,5319	0,6038	0,5945	0,5286	0,4908	0,5623	0,5300±0,0009

APÊNDICE C

DADOS CINÉTICOS DA HIDRÓLISE COM VARIAÇÃO DA CARGA DE CELULASE E β -GLICOSIDASE

Tabela C.1. Dados de celobiose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

g celobiose/g biomassa sem pré-tratar									
tempo min	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	Pto Central
10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
20	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
30	0,0017	0,0000	0,0021	0,0000	0,0000	0,0023	0,0191	0,0000	0,0000
40	0,0071	0,0000	0,0140	0,0019	0,0000	0,0022	0,0132	0,0008	0,0006 \pm 0,0032
50	0,0058	0,0025	0,0230	0,0056	0,0002	0,0127	0,0614	0,0039	0,0055 \pm 0,0019
60	0,0080	0,0033	0,0218	0,0057	0,0003	0,0117	0,0745	0,0051	0,0077 \pm 0,0040
180	0,0090	0,0035	0,0237	0,0052	0,0030	0,0117	0,1180	0,0068	0,0072 \pm 0,0034
540	0,0074	0,0049	0,0194	0,0063	0,0011	0,0076	0,1289	0,0054	0,0062 \pm 0,0005
720	0,0070	0,0055	0,0078	0,0045	0,0026	0,0055	0,1279	0,0045	0,0042 \pm 0,0032
1440	0,0073	0,0032	0,0103	0,0042	0,0023	0,0053	0,1230	0,0031	0,0039 \pm 0,0041
2160	0,0074	0,0032	0,0107	0,0012	0,0025	0,0060	0,1009	0,0031	0,0052 \pm 0,0007
2880	0,0080	0,0030	0,0131	0,0037	0,0025	0,0054	0,0982	0,0024	0,0049 \pm 0,0053
3600	0,0070	0,0029	0,0114	0,0095	0,0025	0,0045	0,0868	0,0028	0,0041 \pm 0,0077
4320	0,0072	0,0019	0,0112	0,0030	0,0027	0,0040	0,0839	0,0025	0,0035 \pm 0,0065

Tabela C.2. Dados de celobiose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

tempo min	g celobiose/L								Pto Central
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	
10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
20	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
30	0,0510	0,0000	0,0646	0,0000	0,0000	0,0696	0,5788	0,0000	0,0000
40	0,2148	0,0000	0,4229	0,0588	0,0000	0,0668	0,4011	0,0253	0,0172±0,0014
50	0,1750	0,0765	0,6954	0,1706	0,0061	0,3845	1,8586	0,1195	0,1652±0,0063
60	0,2435	0,0999	0,6597	0,1721	0,0101	0,3537	2,2571	0,1540	0,2328±0,0012
180	0,2732	0,1070	0,7189	0,1566	0,0900	0,3543	3,5748	0,2049	0,2169±0,0009
540	0,2257	0,1489	0,5874	0,1906	0,0344	0,2303	3,9049	0,1627	0,1864±0,0072
720	0,2121	0,1656	0,2350	0,1361	0,0780	0,1654	3,8740	0,1365	0,1281±0,0046
1440	0,2212	0,0979	0,3122	0,1259	0,0684	0,1593	3,7265	0,0924	0,1188±0,0002
2160	0,2244	0,0969	0,3233	0,0361	0,0772	0,1828	3,0577	0,0954	0,1572±0,0057
2880	0,2412	0,0922	0,3955	0,1121	0,0771	0,1636	2,9755	0,0728	0,1478±0,0041
3600	0,2114	0,0874	0,3457	0,2871	0,0771	0,1378	2,6307	0,0843	0,1236±0,0069
4320	0,2186	0,0563	0,3387	0,0912	0,0821	0,1216	2,5424	0,0758	0,1054±0,0003

Tabela C.3. Dados de glicose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

g glicose/g biomassa sem pré-tratar									
tempo min	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	Pto Central
10	0,0050	0,0004	0,0273	0,0240	0,0000	0,0127	0,0138	0,0000	0,0075±0,0048
20	0,0284	0,0151	0,0799	0,0437	0,0000	0,0432	0,0252	0,0329	0,0299±0,0002
30	0,0193	0,0158	0,0665	0,0591	0,0000	0,0744	0,0303	0,0520	0,0378±0,0045
40	0,0297	0,0248	0,0769	0,1046	0,0054	0,1015	0,0379	0,0624	0,0510±0,0076
50	0,0345	0,0331	0,1078	0,1227	0,0011	0,1266	0,0367	0,0884	0,0676±0,0052
60	0,0363	0,0413	0,0955	0,1414	0,0037	0,1376	0,0415	0,1023	0,0817±0,0041
180	0,0859	0,1006	0,2152	0,2454	0,0216	0,2606	0,0794	0,2090	0,1633±0,0033
540	0,2210	0,2002	0,2521	0,3726	0,0653	0,3674	0,2125	0,3135	0,2672±0,0057
720	0,1987	0,2106	0,3087	0,3587	0,0692	0,3506	0,1925	0,3197	0,2490±0,0077
1440	0,2190	0,2153	0,3461	0,3688	0,1009	0,3892	0,1998	0,3020	0,2687±0,0052
2160	0,2429	0,2463	0,3809	0,3669	0,1068	0,4043	0,2612	0,3474	0,3010±0,0079
2880	0,2733	0,2677	0,3946	0,3734	0,1181	0,4032	0,2906	0,3459	0,3098±0,0038
3600	0,2594	0,2554	0,3909	0,3565	0,1261	0,3799	0,2910	0,3467	0,3033±0,0065
4320	0,2942	0,2753	0,3898	0,3619	0,1343	0,3871	0,3114	0,3411	0,3034±0,0099

Tabela C.4. Dados de glicose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

tempo min	g glicose/L								Pto Central
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	
10	0,1509	0,0112	0,8277	0,7273	0,0000	0,3855	0,4167	0,0000	0,2267±0,0075
20	0,8588	0,4584	2,4210	1,3245	0,0000	1,3081	0,7640	0,9970	0,9048±0,0081
30	0,5842	0,4776	2,0158	1,7915	0,0000	2,2551	0,9169	1,5766	1,1457±0,0006
40	0,8997	0,7504	2,3293	3,1683	0,1642	3,0747	1,1471	1,8892	1,5450±0,0024
50	1,0441	1,0018	3,2649	3,7153	0,0322	3,8350	1,1129	2,6780	2,0483±0,0061
60	1,1008	1,2517	2,8920	4,2847	0,1125	4,1671	1,2579	3,0996	2,4746±0,0079
180	2,6007	3,0474	6,5176	7,4339	0,6538	7,8947	2,4039	6,3322	4,9454±0,0025
540	6,6938	6,0657	7,6355	11,2871	1,9772	11,1286	6,4372	9,4960	8,0929±0,0007
720	6,0202	6,3805	9,3505	10,8653	2,0963	10,6213	5,8315	9,6850	7,5436±0,0032
1440	6,6333	6,5217	10,4841	11,1722	3,0557	11,7882	6,0511	9,1477	8,1384±0,0028
2160	7,3566	7,4597	11,5379	11,1135	3,2337	12,2473	7,9113	10,5230	9,1173±0,0005
2880	8,2785	8,1091	11,9539	11,3122	3,5767	12,2139	8,8013	10,4779	10,2583±0,0018
3600	7,8566	7,7366	11,8407	10,7983	3,8194	11,5075	8,8151	10,5008	9,1863±0,0046
4320	8,9121	8,3385	11,8066	10,9631	4,0687	11,7245	9,4334	10,3319	9,1918±0,0092

Tabela C.5. Dados de xilose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

g Xilose/g biomassa sem pré-tratar									
tempo min	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	Pto Central
10	0,0030	0,0021	0,0114	0,0126	-0,0007	0,0088	0,0065	0,0051	0,0049±0,0021
20	0,0126	0,0097	0,0323	0,0222	0,0016	0,0212	0,0139	0,0173	0,0140±0,0073
30	0,0066	0,0080	0,0234	0,0240	0,0013	0,0250	0,0124	0,0184	0,0123±0,0071
40	0,0094	0,0105	0,0280	0,0367	0,0039	0,0365	0,0153	0,0208	0,0164±0,0028
50	0,0093	0,0088	0,0395	0,0376	0,0004	0,0416	0,0246	0,0275	0,0205±0,0054
60	0,0091	0,0113	0,0461	0,0430	0,0014	0,0448	0,0274	0,0292	0,0246±0,0071
180	0,0293	0,0348	0,0774	0,0750	0,0096	0,0824	0,0541	0,0706	0,0512±0,0097
540	0,0825	0,0827	0,0727	0,1382	0,0368	0,1352	0,0993	0,1175	0,0987±0,0069
720	0,0630	0,0835	0,1152	0,1272	0,0372	0,1290	0,1040	0,1177	0,0935±0,0045
1440	0,0854	0,0906	0,1290	0,1422	0,0503	0,1467	0,1200	0,1147	0,1070±0,0072
2160	0,0945	0,1042	0,1435	0,1444	0,0534	0,1573	0,1179	0,1373	0,1173±0,0094
2880	0,1054	0,1146	0,1498	0,1508	0,0581	0,1589	0,1265	0,1372	0,1211±0,0057
3600	0,1006	0,1088	0,1517	0,1468	0,0616	0,1537	0,1284	0,1433	0,1231±0,0089
4320	0,1140	0,1166	0,1533	0,1550	0,0653	0,1579	0,1334	0,1441	0,1264±0,0036

Tabela C.6. Dados de xilose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

tempo min	g Xilose/L								Pto Central
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	
10	0,0899	0,0623	0,3465	0,3816	-0,0216	0,2653	0,1954	0,1547	0,1498±0,0059
20	0,3824	0,2931	0,9770	0,6723	0,0498	0,6419	0,4224	0,5241	0,4236±0,0048
30	0,1987	0,2419	0,7077	0,7283	0,0386	0,7584	0,3764	0,5570	0,3735±0,0029
40	0,2860	0,3179	0,8489	1,1117	0,1177	1,1050	0,4646	0,6313	0,4957±0,0018
50	0,2805	0,2680	1,1969	1,1378	0,0121	1,2615	0,7447	0,8317	0,6203±0,0003
60	0,2746	0,3437	1,3965	1,3012	0,0433	1,3558	0,8311	0,8836	0,7452±0,0042
180	0,8876	1,0556	2,3448	2,2717	0,2918	2,4961	1,6397	2,1384	1,5511±0,0064
540	2,4989	2,5046	2,2027	4,1850	1,1156	4,0956	3,0075	3,5579	2,9901±0,0093
720	1,9070	2,5302	3,4883	3,8519	1,1256	3,9078	3,1501	3,5664	2,8309±0,0001
1440	2,5858	2,7446	3,9065	4,3079	1,5240	4,4430	3,6362	3,4745	3,2421±0,0056
2160	2,8635	3,1573	4,3457	4,3748	1,6180	4,7646	3,5720	4,1578	3,5521±0,0034
2880	3,1918	3,4711	4,5366	4,5694	1,7608	4,8146	3,8329	4,1575	3,6695±0,0052
3600	3,0468	3,2948	4,5965	4,4475	1,8649	4,6548	3,8896	4,3423	3,7275±0,0049
4320	3,4525	3,5322	4,6439	4,6953	1,9792	4,7819	4,0410	4,3639	3,8287±0,0062

Tabela C.7. Dados de arabinose (g/g) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

g Arabinose/g biomassa sem pré-tratar									
tempo min	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	Pto Central
10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
20	0,0000	0,0000	0,0020	0,0013	0,0000	0,0006	0,0006	0,0010	0,0008±0,0047
30	0,0000	0,0000	0,0014	0,0015	0,0000	0,0000	0,0006	0,0004	0,0008±0,0037
40	0,0000	0,0000	0,0019	0,0016	0,0000	0,0017	0,0006	0,0005	0,0004±0,0059
50	0,0000	0,0000	0,0018	0,0019	0,0000	0,0021	0,0008	0,0010	0,0007±0,0024
60	0,0000	0,0000	0,0018	0,0020	0,0000	0,0020	0,0010	0,0013	0,0009±0,0059
180	0,0000	0,0034	0,0024	0,0023	0,0000	0,0023	0,0014	0,0042	0,0036±0,0042
540	0,0055	0,0072	0,0035	0,0109	0,0030	0,0103	0,0052	0,0096	0,0078±0,0049
720	0,0049	0,0076	0,0079	0,0092	0,0026	0,0093	0,0050	0,0085	0,0077±0,0026
1440	0,0041	0,0061	0,0076	0,0092	0,0028	0,0095	0,0047	0,0073	0,0073±0,0077
2160	0,0049	0,0069	0,0083	0,0083	0,0028	0,0092	0,0050	0,0079	0,0071±0,0089
2880	0,0057	0,0068	0,0087	0,0090	0,0029	0,0094	0,0052	0,0077	0,0076±0,0018
3600	0,0057	0,0061	0,0089	0,0077	0,0031	0,0093	0,0053	0,0077	0,0075±0,0016
4320	0,0068	0,0055	0,0094	0,0091	0,0034	0,0090	0,0054	0,0079	0,0077±0,0049

Tabela C.8. Dados de arabinose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação na carga enzimática

tempo min	g Arabinose/L								Pto Central
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	
10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
20	0,0000	0,0000	0,0596	0,0391	0,0000	0,0173	0,0190	0,0292	0,0250±0,0029
30	0,0000	0,0000	0,0409	0,0460	0,0000	0,0000	0,0170	0,0119	0,0231±0,0043
40	0,0000	0,0000	0,0573	0,0474	0,0000	0,0501	0,0189	0,0149	0,0125±0,0089
50	0,0000	0,0000	0,0550	0,0590	0,0000	0,0634	0,0240	0,0308	0,0200±0,0063
60	0,0000	0,0000	0,0554	0,0617	0,0000	0,0615	0,0294	0,0397	0,0270±0,0067
180	0,0000	0,1037	0,0718	0,0689	0,0000	0,0708	0,0422	0,1263	0,1082±0,0027
540	0,1658	0,2195	0,1065	0,3315	0,0898	0,3130	0,1582	0,2900	0,2356±0,0051
720	0,1480	0,2312	0,2385	0,2781	0,0785	0,2803	0,1514	0,2578	0,2347±0,0007
1440	0,1251	0,1840	0,2299	0,2778	0,0849	0,2867	0,1411	0,2212	0,2201±0,0092
2160	0,1469	0,2093	0,2525	0,2520	0,0857	0,2799	0,1527	0,2404	0,2155±0,0049
2880	0,1722	0,2065	0,2650	0,2735	0,0888	0,2848	0,1588	0,2326	0,2287±0,0059
3600	0,1718	0,1833	0,2705	0,2341	0,0937	0,2804	0,1593	0,2346	0,2277±0,0029
4320	0,2063	0,1666	0,2857	0,2761	0,1021	0,2721	0,1624	0,2388	0,2334±0,0052

APÊNDICE D

RESULTADOS DA COMPOSIÇÃO DA XILANA E LIGNINA USANDO O MESMO BAGAÇO, PRÉ-TRATADO COM DIFERENTES AGENTES. TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO LEPFE-DPQ-FEQ-UNICAMP

Tabela D.1. Composição da xilana e lignina usando o mesmo bagaço, pré-tratado com diferentes agentes

LEPFE	%xilana antes	%xilana depois	%lignina total antes	%lignina total depois	% Rendimento em glicose	Pré- tratamento
Garcia, 2009	23,66	16,58	25,1	9,87	99,00%	H ₂ O ₂
Fuentes, 2009	23,66	21,3	25,1	15,6	78,55%	Ca(OH) ₂
Gomez, 2010	23,66	24,83	25,1	11,56	20,61%	H ₂ SO ₄
Gomez, 2010	23,66	8,72	25,1	13,37	18,48%	H ₂ SO ₄